UNTERSUCHUNGEN ZUR LIMITIERTEN PROTEOLYSE DES INTER-ALPHA-TRYPSIN INHIBITORS

Wolfgang Paulus

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535722_0077

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der
Universität München

Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann

UNTERSUCHUNGEN ZUR LIMITIERTEN PROTEOLYSE DES INTER-ALPHA-TRYPSIN INHIBITORS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Paulus
aus
Straubing

München 1979

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. Hochstraßer

Mitberichterstatter: Prof.Dr.H.H.Naumann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dez. 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar bis Oktober 1977 in der Laborabteilung der Hals-Nasen-Ohren--Klinik der Universität in München durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. Karl Hochstraßer

danke ich herzlich für die Ermöglichung und die großzügige Förderung dieser Arbeit, für die guten Arbeitsbedingungen und besonders für das mir entgegengebrachte Wohlwollen und sein Interesse an der Arbeit.

Für die anregenden Diskussionen, die stete Unterstützung sowie Anleitung bei den durchgefürten Untersuchungen möchte ich

Herrn Privat-Dozent Dr. Günter Bretzel

besonders danken.

Mein Dank gilt ferner Frau Ingrid Rossmanith für ihre Hilfe bei vielen Untersuchungen und Frau Katrin Lempart für die Durchführung der Immunelektrophoresen.

Meiner Mutter

in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole	III
1. Einleitung	1
1.1. Funktionelle Besonderheit des säurestabilen Serum- und Urininhibitors	3
1.2. Umwandlung des ITI durch limitierte Proteolyse	4
1.3. Strukturanalysen	6
1.3.1. Säurestabile Proteaseinhibitoren aus dem menschlichen ITI	6
1.3.2. Inhibitoren aus dem Rinderserum	10
1.4. Themenstellung	12
2. Anreicherung von Rinder-ITI	13
2.1. Nachweismethode für den ITI	13
2.2. Trennung der Serumproteine mittels Ionenaustauscher	13
2.3. Ausfällung mit Neutralsalz	16
2.4. Auftrennung durch Filtration über Bio-Gel A-5m	16
2.5. Ergebnis	17
2.6. Schnelle ITI-Gewinnung	17
2.7. Ergebnis	19
3. Inkubation von ITI mit verschiedenen Gewebsarten	20
3.1. Präparation der Gewebe	20
3.2. Vorbereitung der Testansätze	21
3.3. Die Gewebsversuche im Einzelnen	23
3.3.1. Gewebsart: Rinderniere	23
3.3.2. Gewebsart: Rinderlunge	25
3.3.3. Gewebsart: Speicheldrüse	26
3.3.4. Gewebsart: Bauchspeicheldrüse	28
3.3.5. Gewebsart: Leber	29
3.3.6. Gewebsart: Milz	31

3.3.7. Gewebsart: Lymphknoten 32
3.3.8. Andere Gewebe 34
3.4. Ergebnis 34
4. Genauere Charakterisierung eines freisetzenden Enzyms 36
4.1. Präparation des Milzsaftes 37
4.2. Auftrennung der Proteine des Milzsaftes im Ionenaustauscher 38
4.3. Testung der einzelnen Eiweißfraktionen 39
4.3.1. Testung mit Azocasein 39
4.3.2. Tests mit ITI 42
4.4. Charakterisierung des ITI-spaltenden Enzyms aus dem Durchlauf 46
4.4.1. pH-Optimum 46
4.4.2. Gel-Filtration zur Bestimmung des Molekulargewichts 48
4.4.3. Charakterisierung des freigesetzten Inhibitors 51
5. Material 53
6. Zusammenfassung 55
Literaturverzeichnis 58
Lebenslauf 60

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

BAPA	Benzoyl-L-Arginin-p-Nitroanilid
^{o}C	Grad Celsius
dE	Delta E = Extinktionsdifferenz
h	Stunden
ITI	Inter-alpha-Trypsin Inhibitor
I 14	Säurestabiler Inhibitor mit Molekulargewicht von etwa 14 000.
I 34	Säurestabiler physiologischer Inhibitor mit Molekulargewicht von etwa 34 000.
M	Molarität
MG	Molekulargewicht
mIU	Milli Inhibitor Units
min	Minuten
N	Normalität
Tris	Trishydroximethylaminomethan
TRA	Triäthanolamin
Upm	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung

Schon Shulman (25) und Astrup (1)(2) hatten entdeckt, daß im menschlichen Serum in geringer Menge säurestabile Proteaseinhibitoren vorhanden sind. Die Molekulargewichte dieser zum Teil gereinigten Inhibitoren wurden von den Entdeckern zwischen 20 000 und 70 000 angegeben.
1971 isolierten Hochstraßer et al. einen säurestabilen Inhibitor für neutrale Proteasen aus menschlichem Nasen- und Bronchialsekret(18)(19).Bei der Untersuchung der Hemmwikung von Bronchialsekret gegen das Modellenzym Trypsin konnte gezeigt werden, daß sie zu 80% von einem schleimhautspezifischen, niedermolekularen und säurestabilen Inhibitor ausgeht, während der humorale Proteinaseninhibitor Alpha-1 Antitrypsin mit einem Hemmanteil von etwa 20% eine untergeordnete Rolle spielt.
In Reihenuntersuchungen an Bronchialsekreten wurde festgestellt, daß physiologischerweise etwa 80% der insgesamt vorhandenen inhibitorischen Aktivität in freier aktiver Form und 20% in maskierter Form vorkommen, wobei in keinem Fall freie proteolytische Aktivität, als dessen Hauptquelle man Proteasen aus zerfallenen Leucocyten ansieht, vorhanden war. In einer Gruppe von länger intubierten Patienten mit "Bronchitischem Syndrom" war das Verhältnis umgekehrt (23). Bei fortgeschrittenen Obstruktionen werden zwar noch leucocytäre Proteasen, vom lokalen Inhibitor inaktiviert, gebildet, es treten aber zunehmend Proteasen (aus Bakterien oder Gewebe) auf, die offensichtlich mit dem Schleimhautinhibitor nicht in Wechselwirkung treten können. Daraus muß man ableiten, daß der Anteil von komplex gebundenem Inhibitor in den Sekreten ein Indikator für die Stärke abgelaufener Entzündungsvorgänge ist(17).
1972 entdeckte Procksch ebenfalls, daß der menschliche Trypsin-Inhibitor aus dem Urin, der auch als Meningin bekannt ist, mit

Inter-alpha-Trypsin Inhibitor eine Kreuzreaktion zeigt. Er bestimmte für Meningin ein Molekulargewicht von etwa 70 000 (22). 1973 isolierten Hochstraßer et al. säurestabile antitryptische Aktivität aus säuregefälltem und nativem Serum und aus dem Urin mittels Trypsin-Harz und Affinitätschromatographie (11). Sie konnten zeigen, daß die antitryptische Aktivität, die im Normalserum zwischen 5 und 8 mIU/ml beträgt, durch säurestabile Inhibitoren mit identischen Molekulargewichten von ca. 22 000 (bestimmt durch Gel-Filtration) verursacht wird. Auch zeigte sich eine immunologische Kreuzreaktion mit Antikörper gegen den Inter-alpha-Trypsin Inhibitor (abgekürzt ITI) aus dem Serum (22). Der Inhibitor aus dem Urin war identisch mit dem aus dem Serum: Ihre Aminosäurezusammensetzung, ihre elektrophoretische Beweglichkeit und ihre immunologische Kreuzreaktion mit dem ITI stimmten völlig überein.

Auch einige Präparationen des säurestabilen Inhibitors aus dem Bronchialsekret zeigten immunologisch Ähnlichkeit mit dem Inter-alpha-Trypsin Inhibitor (12). Beide Inhibitoren scheinen nicht nur die Antigendetermination gemeinsam zu haben, sondern besitzen wahrscheinlich auch das gleiche Hemmzentrum, denn beide sind sog. Arginin-Inhibitoren mit einem Arginin-Rest im sog. Hemmzentrum. Aufgrund der verschiedenen Hemmspektren und des verschiedenen Abbaumusters durch Trypsin wurde jedoch geschlossen, daß diese Inhibitoren nicht identisch sind mit denen aus dem Serum und/oder Urin (7). Der niedermolekulare Inhibitor kommt zumindest in der Form, in der er im Sekret vorliegt, im Blutserum nicht vor, sodaß er eher als spezifisches Produkt des Flimmerepithels aufgefaßt werden muß (24). Neuere Untersuchungen (16) haben aber gezeigt, daß der humorale Inter-alpha-Trypsin Inhibitor als Inhibitogen niedermolekularer Inhibitoren anzusehen ist.

Die starke Ähnlichkeit im antigenen Verhalten all dieser Inhibitoren war der Grund dafür, daß die weiteren Untersuchungen zunächst mit ITI und dessen Abbau-Inhibitoren fortgesetzt wurden.

1.1. Funktionelle Besonderheit des säurestabilen Serum- und Urin-Inhibitors

Zunächst wurde angenommen, daß der säurestabile Inhibitor dauernd vom hochmolekularen Inter-alpha-Trypsin Inhibitor freigesetzt wird, daß sich dazu ein unbekannter Prozeß intravasal abspielen muß, und daß die Ausscheidung des abgespaltenen Inhibitors in der Niere erfolgt.
Bei nierengesunden Individuen zeigten sich nach Enteiweißung im Serum Inhibitorkonzentrationen, die zwischen 5 und 10 mIU/ml liegen. Die größten beobachteten Häufigkeiten lagen bei 6, 7 und 8 mIU/ml Serum. In diesen Häufigkeitsgruppen lagen die mittleren Harnkonzentrationen bei 8 bis 10 mIU/ml Urin. Die Tagesausscheidung des Inhibitors variiert zwischen 8 000 und 22 000 mIU (14). Dies zeigt, daß die Inhibitorkonzentration im Serum physiologischerweise in sehr engen Grenzen gehalten wird und daß der säurestabile Inhibitor offensichtlich glomerulär filtriert wird. So lag es nahe zu testen, ob sich Störungen der Nierenfunktion durch Veränderung der Inhibitor-Serumspiegel bemerkbar machen. An vielen Patienten mit Nephropathien verschiedener Genese wurde dies überprüft und die Ergebnisse belegten, daß in allen Fällen eindeutige Erhöhungen der Inhibitor-Serumspiegel bei gestörter Creatinin-Clearance auftraten; sie zeigten eine nahezu lineare Beziehung zur Creatininkonzentration, wobei die Serumspiegel des säurestabilen Inhibitors bis zum 20-fachen des Normalwertes anstieg (10).
Es konnte auch gezeigt werden, daß es nach Nierentransplantationen durch Serienbestimmungen in kürzeren Zeitabständen möglich ist, die Funktionsaufnahme des Transplantates zu beurteilen; dies auch in Fällen, bei denen immer wieder eine Dialyse erforderlich war und das Serum-Creatinin somit längere Zeit als Indikator für die Nierenfunktion ausfiel. Eindeutig konnte man mit dieser Methode auch eine Abstoßungskrise trotz fallender Creatininspiegel prognostizieren ((4),(14),(15)).

1.2. Umwandlung des ITI durch limitierte Proteolyse

Man versuchte zunächst herauszufinden, ob der säurestabile Inhibitor im Serum in freier Form vorliegt, oder als Enzym-Inhibitor-Komplex, der durch die verschiedenen Behandlungen bei der Aufarbeitung gespalten wird. Anschließend versuchte man, die Molekulargewichte zu bestimmen, da die Ergebnisse verschiedener Forscher nicht übereinstimmten. Dies konnte auf der Basis der Ergebnisse, die die nachfolgend beschriebenen Versuche erbrachten, aufgeklärt werden.

1. Serum und Urin wurden mit Perchlorsäure enteiweißt; der Überstand wurde mittels Dialyse entsalzt und danach konzentriert. Dieser konzentrierte Überstand wurde auf Sephadex G 75 fraktioniert. Aus der Größe des Elutionsvolumens wurde für den sogenannten physiologischen Inhibitor ein Molekulargewicht von etwa 60 000 ermittelt. Da der gereinigte Inhibitor eine spezifische Aktivität von 650 mIU/ml hat, kann ein theoretisches Molekulargewicht von maximal 34 000 angenommen werden.

2. Serum von Patienten, die einen hohen Spiegel säurestabiler Aktivität zeigten, wurde unter ähnlichen Bedingungen behandelt. Das Elutionsvolumen für diesen Inhibitor war ebensogroß, wie das für den Inhibitor aus enteiweißtem Serum. Ähnliche Ergebnisse konnte man finden, wenn man nativen und deproteinisierten Urin auf Sephadex G 75 filterte. Daraus ergibt sich, daß hinsichtlich des physiologischen Inhibitors kein Unterschied besteht, ob er aus nativem oder deproteinisiertem Serum oder aus Urin isoliert wird. Der säurestabile physiologische Inhibitor ist also sowohl im Serum als auch im Urin in unmaskierter, aktiver Form vorhanden.

3. Die gesamte antiproteolytische Aktivität konnte aus enteiweißtem Serum und Urin durch Affinitätschromatographie isoliert werden. Jedoch zeigte die Gel-Filtration, daß der grösste Teil der Inhibitoren, die auf diese Weise isoliert worden

waren, ein Molekulargewicht von etwa 14 000 hatten. Bei dem Elutionsvolumen, mit dem der physiologische Inhibitor eluiert wurde, fand sich nur eine geringe Aktivität; daneben wurde noch ein ganz geringer Anteil eines dritten Inhibitors mit einem Molekulargewicht von etwa 8 000 gefunden. Offensichtlich reagiert der physiologische Inhibitor mit dem immobilisierten Trypsin des Harzes, sodaß ein Abbau des Moleküls ohne Aktivitätsverlußt eintritt.

4. Bei Inkubation des physiologischen Inhibitors mit einem Überschuß von löslichem Trypsin wird dieser komplett in ein Produkt übergeführt, das mit dem niedermolekularen Inhibitor der Affinitätschromatographie identisch ist. Wie der physiologische Inhibitor zeigt auch dieser Inhibitor eine immunologische Kreuzreaktion mit ITI.

5. Bezieht man sich nur auf die Serumspiegel der säurestabilen Inhibitoren, so ist es möglich, mit Trypsin als Modellenzym eine Nephropathie zu imitieren: Im Experiment wurden die Seruminhibitoren durch Titration mit Trypsin gesättigt. Sobald das Äquilibrium erreicht war, wuchs die säurestabile inhibitorische Aktivität bis zu einem gewissen Extremwert an; der jedoch war in seiner Höhe von Serum zu Serum verschieden. Wurden die Serumproteine mit Perchlorsäure enteiweißt, das Sediment in Puffer wieder aufgenommen, neutralisiert und dann mit Trypsin inkubiert, so zeigte sich, daß ebensoviel inhibitorische Aktivität vorhanden war, wie bei Trypsinspaltung des nativen Serums. Trypsin setzt also aus nativem und denaturiertem Serum jeweils die gleiche Menge säurestabilen Inhibitors frei. Die freisetzbare Menge korrelierte mit den jeweiligen Spiegeln von Inter-alpha-Trypsin Inhibitor im Serum.

6. Weiter zeigte sich, daß die säurestabile antiproteolytische Aktivität auch von nativem und denaturiertem gereinigten Inter-alpha-Trypsin Inhibitor durch Behandlung mit Trypsin freigesetzt werden kann. Die Menge des entstandenen säurestabilen

Inhibitors war proportional zur vorhandenen Menge ITI. Die freigesetzten Inhibitoren zeigten die gleichen immunologischen und biochemisch-chemischen Eigenschaften wie die Inhibitoren, die aus dem physiologischen I 34 nach Trypsin-Behandlung isoliert worden waren (7).

7. Die referierten Beobachtungen machen deutlich, daß der physiologische Inhibitor aus dem Inter-alpha-Trypsin Inhibitor, der als Big-Inhibitor klassifiziert worden ist, durch limitierte Proteolyse freigesetzt wird. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß Trypsin oder irgend ein anderes Verdauungsenzym aus dem Pankreas das physiologischerweise spaltende Enzym ist. Es ist anzunehmen, daß das freisetzende Enzym eine Protease ist, die weder vom Substrat Inter-alpha-Trypsin Inhibitor, noch vom freigesetzten Produkt I 34 gehemmt wird. Gegenwärtig kennt man nur ein Enzym, das beide Eigenschaften ganz erfüllt, nämlich das hochspezifische Kallikrein. Kallikrein aus dem Schweine-Pankreas setzte in in-vitro Experimenten in einer langsamen Reaktion einen säurestabilen Inhibitor frei, der immunologisch und chemisch nicht vom physiologischen I 34 unterschieden werden kann (3).
   In neueren Experimenten zeigte sich, daß auch menschliches Plasmin einen säurestabilen Inhibitor aus dem ITI freisetzen kann. Menschliches Plasmin wird vom ITI nicht, vom physiologischen Inhibitor kaum gehemmt.

Nach diesen Ergebnissen ergibt sich folgende Zusammenfassung: Aus dem Inter-alpha-Trypsin Inhibitor im Serum wird permanent ein säurestabiler Inhibitor mit einem Molekulargewicht von 34 000 freigesetzt und im Urin ausgeschieden. Als Enzyme, die den ITI zum I 34 abbauen, sind bislang nur Kallikrein und Plasmin bekannt. Der physiologische I 34 kann durch einen Überschuß von Trypsin - über einen Trypsin-Inhibitor-Komplex - zu einem inhibitorisch wirksamen Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 14 000 (I 14) abgebaut werden. Dieser letztere Inhibitor entsteht auch direkt aus dem ITI durch Behandlung mit Trypsin. Schließlich war

es möglich, auch das Vorkommen geringerer Mengen eines Inhibitors mit einem Molekulargewicht von etwa 8 000 in einigen Trypsin-behandelten Proben zu erklären: Es war möglich, den I 14 zu 70% in ein inhibitorisch wirksames Produkt mit einem Molekulargewicht von etwa 8 000 überzuführen; dies gelang durch prolongierte Inkubation mit Trypsin. Dieser kleinste gefundene Inhibitor zeigte wie ein ähnlicher, der als Nebenprodukt bei der Affinitätschromatographie gefunden worden war, keine immunologische Kreuzreaktion mit dem ITI mehr. Abb. 1 zeigt schematisch die oben beschriebenen experimentellen Ergebnisse.

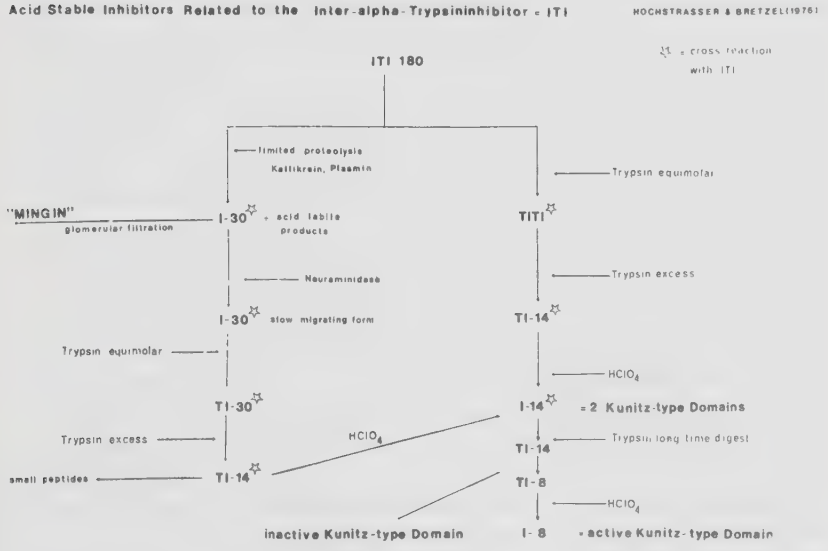

Abb.1: Schema der bisher bekannten säurestabilen Inhibitoren, die in einer Beziehung zum Inter-alpha-Trypsin Inhibitor = ITI stehen.

1.3. Strukturanalysen

1.3.1. Säurestabile Proteaseinhibitoren aus menschlichem ITI

Die oben aufgeführten Ergebnisse regten zur Ermittlung der Aminosäuresequenz der Inhibitors mit Molekulargewicht 14 000, der durch Trypsinbehandlung entsteht, an. Chromatographie zeigte, daß die beiden Inhibitoren, die aus dem Urin und aus dem Serum gewonnen wurden, absolut identisch waren. Daher wurden für die weiteren Arbeiten Urin-Inhibitor als Startmaterial benützt.
Das erste Peptid nach tryptischer Spaltung hatte die Sequenz Gly-Pro-Cys-Arg. Diese Sequenz ist charakteristisch für das aktive Zentrum eines Inhibitors vom Kunitz-Typ. Jedoch war das Molekulargewicht dieses Inhibitors zweimal so groß, als man es von einem Inhibitor vom Kunitz-Typ erwarten sollte. Diese Tatsache war zwar verwirrend, konnte jedoch auf der Basis folgender Befunde erklärt werden: Laskowski jr. fand bei Ovomukoiden (Inhibitoren mit variablem Hemmspektrum) und Hochstraßer bei Inhibitoren aus der Glandula submandibularis des Hundes, daß diese Inhibitoren vom Kazal-Typ aus 3 bzw.2 strukturhomologen Domains bestehen. Man vermutete deshalb, daß der säurestabile I 14 das erste Beispiel eines doppelköpfigen Inhibitors vom Kunitz-Typ sei. Zusätzlich konnte dieser Inhibitor durch Trypsin in einen anderen mit halbem Molekulargewicht des Startinhibitors gespalten werden; dies ist ebenfalls wieder ähnlich den Entdeckungen Laskowskis jr. et al., die er im Rahmen seiner Forschungen mit den Ovoinhibitoren machte. Diesen Autoren war es gelungen, die Peptidbindungen zwischen den 3 Domains der Ovoinhibitoren durch chemische und enzymatische Methoden zu spalten und die Domains vom Kazal-Typ einzeln darzustellen (20). Analog fand man identische tryptische Peptide im I 14 und in dem kleineren Inhibitor mit MG 8 000, den man durch prolongierte Inkubation mit Trypsin erhalten hatte.

Das Ergebnis dieser Studien zeigte, daß die Aminosäuresequenz des Inhibitors mit MG 8 000 homolog ist zur Sequenz der gut bekannten Inhibitoren vom Kunitz-Typ. Der zuerst aus dem I 34 freigesetzte I 14 hat die gleiche Aminosäuresequenz, jedoch zusätzlich einen verlängerten N-Terminus. Die komplette Sequenz des Inhibitors mit MG 14 000 zeigt die Abb.2, aus der zu ersehen ist, daß das gesamte Molekül aus 2 homologen Domains vom Kunitz-Typ besteht. Ein Kopf davon ist inhibitorisch aktiv, der andere inaktiv; dies ist durch einen Aminosäureaustausch am aktiven Zentrum zu erklären. Eine Arg-Thr-Bindung, die zwischen beiden Domains lokalisiert ist, ermöglicht die tryptische Spaltung und Trennung der beiden Domains. Zum Vergleich ist in der Abbildung auch die Aminosäuresequenz des gut bekannten Inhibitors vom Kunitz-Typ aus Rinderorganen (BPTI = basic pancreatic trypsin inhibitor) mit aufgenommen.

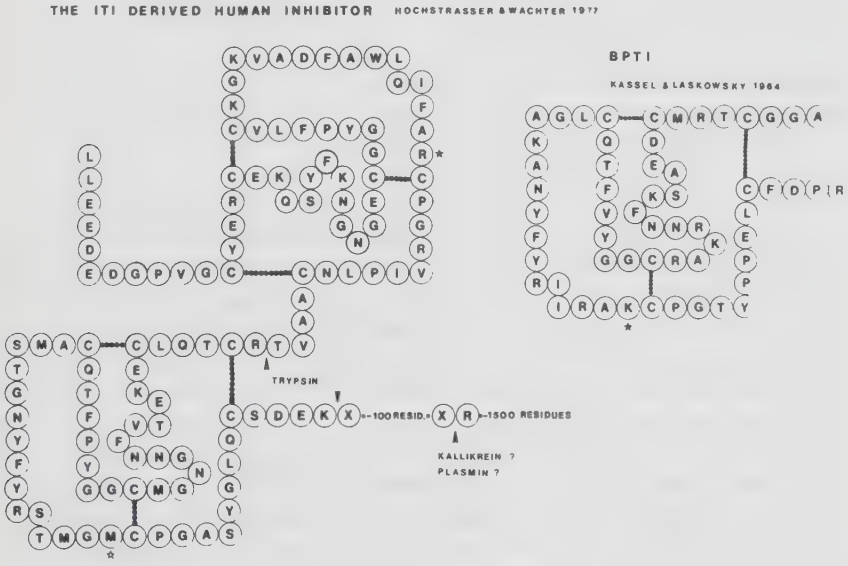

Abb.2: Die Aminosäuresequenz des säurestabilen Inhibitors mit dem MG 14 000 im Vergleich zum BPTI.

1.3.2. Inhibitoren aus dem Rinderserum

Fundamentale Ergebnisse über den Mechanismus von Enzym-Inhibitor-Interaktionen wurden aus den Studien mit den Rinderinhibitoren vom Kunitz-Typ gewonnen. Im Hinblick auf die überraschende Strukturhomologie des trypsinhemmenden Teils des humanen Inter-alpha-Trypsin Inhibitors versuchte man nun auch, die Struktur des trypsinhemmenden Teils der korrespondierenden Rinderinhibitoren zu analysieren, falls er existieren sollte.
Dazu wurde Rinderserum in ähnlicher Weise wie vorher Humanserum mit einem Überschuß von Trypsin versetzt, sodaß säurestabile Inhibitoren freigesetzt wurden (1). Nach Inkubation und anschliessender Eiweißfällung mit Perchlorsäure konnten im Überstand 2 Inhibitoren isoliert werden. Die ermittelten Molekulargewichte dieser Inhibitoren waren denen der humanen säurestabilen Inhibitoren vergleichbar. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse, die in Abbildung 3 schematisch dargestellt sind, zeigen, daß die Rinderinhibitoren ebenfalls aus zwei Domains vom Kunitz-Typ bestehen und strukturhomolog zu jedem anderen und auch zum korrespondierenden menschlichen Inhibitor sind.
Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, daß hinsichtlich der Sequenz eine eindeutig nähere Verwandtschaft zwischen den Inhibitoren vom Kunitz-Typ besteht, die aus dem Serum der beiden Spezies Mensch und Rind isoliert worden sind, als zwischen den bekannten einköpfigen Kunitz-Inhibitoren, insbesondere dem basischen Rinderinhibitor und dem Cow-Colostrum-Inhibitor. Offensichtlich haben die Gene für Inhibitoren vom Kunitz-Typ in Spezies mit höherem Evolutionsgrad verschiedene Expression. Ähnliche Schlüsse bezüglich der Ovoinhibitoren wurden zuletzt von Laskowski jr. et al. gezogen (20). Die Gene für die Produktion dieser Inhibitoren vom Kazal-Typ sind in den Vögeln in drei verschiedenen Expressionsstufen vorhanden. Dasselbe gilt wahrscheinlich auch für die anderen Inhibitoren vom Kazal-Typ. Schließlich konnte auch gezeigt werden, daß die zwei Domains vom Kazal-Typ des Inhibitors

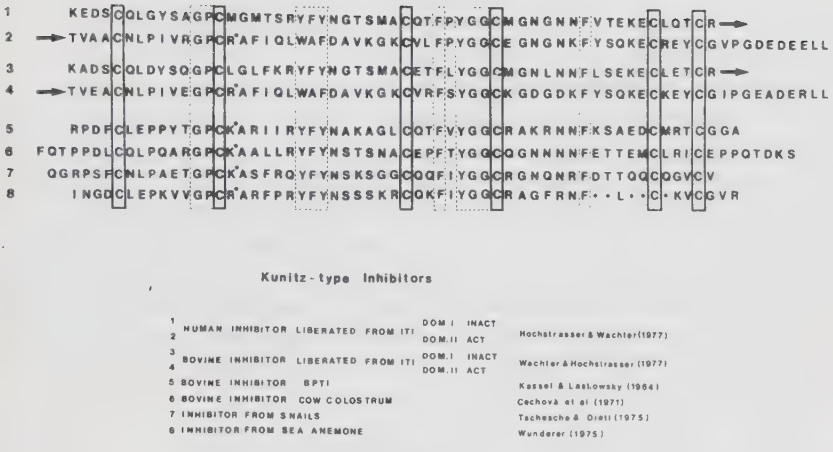

Abb.3: Aminosäuresequenzen verschiedener Kunitz-Typ Inhibitoren.

aus der Glandula submandibularis des Hundes und das eine Domain aus dem Inhibitor des Hundepankreas (8) auch homolog aber nicht identisch sind.
Die Konsequenzen aus den aufgezeigten Ergebnissen für die Theorie der Evolution der Inhibitoren vom Kunitz-Typ können im Detail erst diskutiert werden, wenn die komplette Aminosäuresequenz des Inter-alpha-Trypsin Inhibitors bekannt ist. Vorläufige Ergebnisse lassen schließen, daß noch mehr inhibitorisch aktive Zentren in diesem Molekül vorhanden sind, das über viele Jahre hinweg als ein physiologisch unwichtiges Protein im Serum angesehen wurde.

1.4. Themenstellung

Da Proinhibitor-Inhibitor-Systeme auch im Serum von Vögeln und Fischen vorhanden sind, muß ihnen eine gemeinsame und wichtige physiologische Aufgabe zugeschrieben werden. Vorraussetzung für ein besseres Verständnis jedoch ist die Aufdeckung des physiologisch aktiven Aktivators und/oder Antagonists dieses Systems. Versuche mit den bisher bekannten Enzymen, die den physiologischen I 34 freisetzen, haben gezeigt, daß Kallikrein nur sehr langsam katalysiert und Plasmin vom entstehenden Produkt I 34 - wenn auch schwach - gehemmt wird. Da im Serum bislang keine weiteren freisetzenden Proteasen gefunden werden konnten, lag es nahe, nach einem solchen Inhibitor-Liberator in Geweben zu suchen. Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden Gewebe vom Rind benutzt. Serum - ebenfalls vom Rind - wurde für die Herstellung des Rinder-ITI gebraucht.

2. Anreicherung von Rinder-ITI

2.1. Nachweismethode für den ITI

Als einzig sichere Nachweismethode für den Inter-alpha-Trypsin Inhibitor wurde die Freilegung von säurestabilen Inhibitoren durch Trypsin akzeptiert. Dazu wurde zu 1 ml der jeweils zu testenden Substanz Trypsin vom Rind im Überschuß zugegeben. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde mit 0,1 ml Perchlorsäure (70%) denaturiert. Nach 15-minütiger Säureeinwirkung wurde mit 4 000 Upm zentrifugiert, der Überstand mit einer Pipette abgenommen, mit 5 N Natronlauge neutralisiert und die antitryptische Aktivität im Trypsin-Hemmtest (6) gemessen.

2.2. Trennung der Serumproteine mittels Ionenaustauscher

Verwendet wurde dazu eine DEAE-Cellulose-Säule von 420 mm Länge und einem Durchmesser von 55 mm. Daraus errechnet sich ein Volumen von 810 ml. Die Säule wurde mit 0,04 M Tris, dem sog. Anfangspuffer, gespült, danach mit einer Mischung aus 1 l Rinderserum und 1 l Anfangspuffer beladen. Die Säule wurde dann mit Anfangspuffer gewaschen, bis alles Hämoglobin ausgespült war.
Zur nachfolgenden Gradientenelution wurde ein Gradientenmixer Typ LKB 11 300 Ultrograd verwendet. Für die theoretischen Überlegungen wurde eine Arbeit von Peterson und Chiazze (24) herangezogen, in der sie von einer Gradientenelution mit 9 kommunizierenden Kammern berichten. Bei einem Säulendurchmesser von 22 mm und einer -länge von 300 mm verwendeten sie ein Elutionsvolumen von 7 650 ml. Diese Zahlen wurden auf unsere Verhältnisse umgerechnet und es ergab sich ein erwünschtes Elutionsvolumen von ca. 26 l, 18 l Anfangspuffer und 8 l Endpuffer.

In der gleichen Arbeit berichten Peterson und Chiazze ferner vom Elutionsverhalten verschiedener Proteine. Einem Diagramm ist zu entnehmen, daß Serumalbumin bei einer Konzentration von 0,07 M PO_4^{2-} eluiert; dies entspricht - bei Verwendung unserer Puffer - einem pH um 6,5. Um besonders gründlich Albumin aus der Säule zu entfernen, wurde in diesem Bereich länger eluiert; dies zeigt sich in der Gradientenmischungsvorlage (Abb. 4) als Plateau.

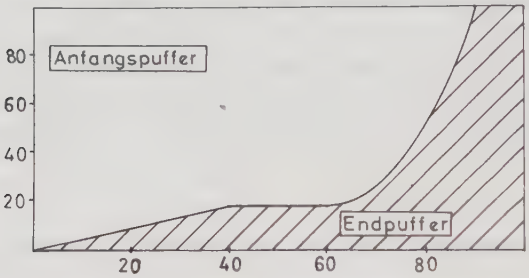

Abb.4: Verkleinerte Gradientenmischungsvorlage des LKB 11 300 Ultrograd zur Elution von ITI aus DEAE-Cellulose.

Die Elutionsflüssigkeit sollte in 96 Stunden durch die Säule gepumpt werden, dies entspricht einer Pumpleistung von etwa 4,8 ml/min; tatsächlich konnten nur 3,5 ml/min gepumpt werden, also nur etwa drei Viertel der vorgesehenen Menge. Erst ab dem Ende des Plateaus wurde damit begonnen, die Elutionsflüssigkeit in Fraktionen von etwa 25 ml zu sammeln und jede 8. Fraktion im Trypsin-Hemmtest auf ihre antitryptische Aktivität zu untersuchen. Die ermittelte Hemmkurve zeigt Abb.5, in der auch eine Kurve der pH-Werte der einzelnen Fraktionen mit aufgenommen wurde.

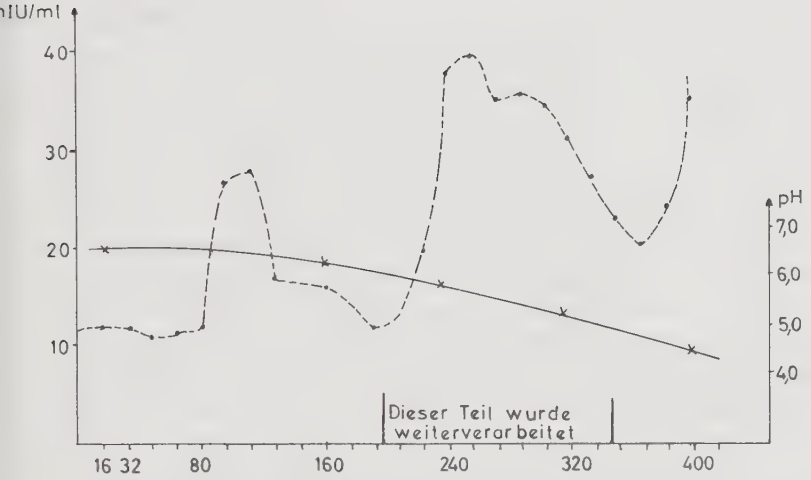

Abb.5: Mit dem Trypsin-Hemmtest ermittelte Hemmkurve (•-------•) und pH-Werte der einzelnen Fraktionen (×———×).

Zu den letzten Hemmtests, ab Fraktion 350 etwa, konnte nachgewiesen werden, daß der pH in den Meßküvetten nicht mehr konstant bei 7,8 war, sodaß das eingesetzte Trypsin pH-abhängig geringere Aktivität zeigte und somit eine Hemmung vortäuschte. Dies ist die Ursache für die scheinbar am Ende der Kurve nocheinmal ansteigende inhibitorische Aktivität. Eine discelektrophoretische Kontrolle hingegen zeigte, daß ITI etwa ab Fraktion 220 eluiert wurde. Für die weitere Verarbeitung wurden die Fraktionen 220 bis 350 verwendet, sie ergaben vereinigt eine Lösung mit einem Volumen von 2 l und einem pH von 5,2.

2.3. Ausfällung mit Neutralsalz

Die 2 l Flüssigkeit sollten nun auf ein kleineres Volumen gebracht werden. Dazu wurde eine Amicon Druckkammer mit einem Diaflo Ultrafilter Typ PM 10 und ein Druck von 5 atü verwendet. Nachdem die Lösung auf 200 ml konzentriert war, wurde sie mit 2 N Natronlauge auf pH 7,8 eingestellt und im Eiswasserbad mit Ammoniumsulfat versetzt, bis die Lösung 2,15 M zu $(NH_4)_2SO_4$ war. Mittels Magnetrührer wurde 60 min gerührt, dann wurde die Lösung 30 min lang bei 18 000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 10 ml Natriumacetatpuffer, dem Puffer der Gel-Säule, gelöst.

2.4. Auftrennung durch Filtration über Bio-Gel A-5m

Diese 10 ml Lösung wurden auf eine Bio-Gel A-5m - Säule gegeben (2,8 x 230 cm) und Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 20 ml aufgefangen. Jede dritte Fraktion wurde anschließend im Trypsin-Hemmtestauf antitryptische Aktivität geprüft; die dazu gehörige Hemmkurve zeigt Abb.6.

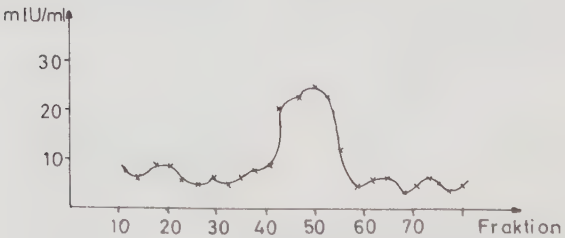

Abb.6: Trypsin-Hemmkurve nach Bio-Gel A-5m - Filtration.

Die Fraktionen 43 bis 60 wurden in der Amicon Druckkammer auf 50 ml konzentriert, zweimal mit 0,1 M Tris-Puffer wieder auf 400 ml verdünnt und wieder konzentriert, um das im Säulenpuffer vorhandene Natriumacid und Benzamidin möglichst stark zu verdünnen.

2.5. Ergebnis

Mit dem beschriebenen Verfahren ist es möglich, aus 1 l Rinderserum etwa 5 000 mIU Inter-alpha-Trypsin Inhibitor zu gewinnen. Es zeigte sich jedoch, daß die Spontanzerfallsrate sehr hoch war: Die ITI-Lösung verlor in tiefgekühltem Zustand (bei -18°C) in zwei Wochen ca. 50% seiner antitryptischen Aktivität. Deshalb war es notwendig, ITI möglichst schnell zu gewinnen und sofort weiter zu verarbeiten. Außerdem wurde für die nachfolgenden Gewebeversuche kein sehr großer Wert auf Sauberkeit gelegt, da auch die verwendeten Gewebslösungen nicht homogen waren. Es wurde jedoch sorgsam darauf geachtet, daß keine anderen Seruminhibitoren, insbesondere kein Alpha-1 Antitrypsin, in der endgültig verwendeten ITI-Lösung vorhanden waren. So wurde also Inter-alpha-Trypsin Inhibitor für Gewebsversuche wie im Folgenden beschrieben vorbereitet.

2.6. Schnelle ITI-Gewinnung

Es fanden wiederum DEAE-Cellulose SH 23, Anfangs- und Endpuffer Verwendung. Wie schon erwähnt, beschreiben Peterson und Chiazze, daß Serumalbumin zum Großteil bei einer Konzentration von 0,07 M PO_4^{2-} eluiert. Ferner zeigt die in Abbildung 5 eingetragene pH-Kurve, daß Inter-alpha-Trypsin Inhibitor zwischen pH 5,8 und 5,0 eluiert.

So wurde also die DEAE-Cellulose der Säule (810 ml) mit 2 l Rinderserum versetzt und 15 min bei Zimmertemperatur gerührt. Die nunmehr beladene Cellulose wurde sodann durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 3 000 Upm sedimentiert, der Überstand verworfen. Dann wurde das Sediment dreimal mit einer Mischung aus Anfangs- und Endpuffer im Verhältnis 85 : 15 - dies entspricht dem Plateau der Gradientenmischungsvorlage - aufgrührt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Die Elution des ITI erfolgte dann mit zweimal einem Liter Endpuffer.
Diese Lösung wurde nun in der Amicon Druckkammer konzentriert und wie unter 2.3. beschrieben, mit Ammoniumsulfat gefällt und zentrifugiert. Das Sediment wurde dann in 20 ml Ammoniumacetat-Puffer gelöst und auf einer Sephadex G 100 - Säule filtriert. Es wurden wieder 20-ml-Fraktionen aufgefangen und die Testung erfolgte wie beschrieben mittels Trypsin-Hemmtest. Abb.7 zeigt eine solche Hemmkurve nach Sephadex G 100. Es wurden hier die Fraktionen 20 mit 24 verwendet; sie wurden vereinigt und wieder, wie unter 2.4. angegeben, mit 0,1 M Tris - Puffer verdünnt und konzentriert.

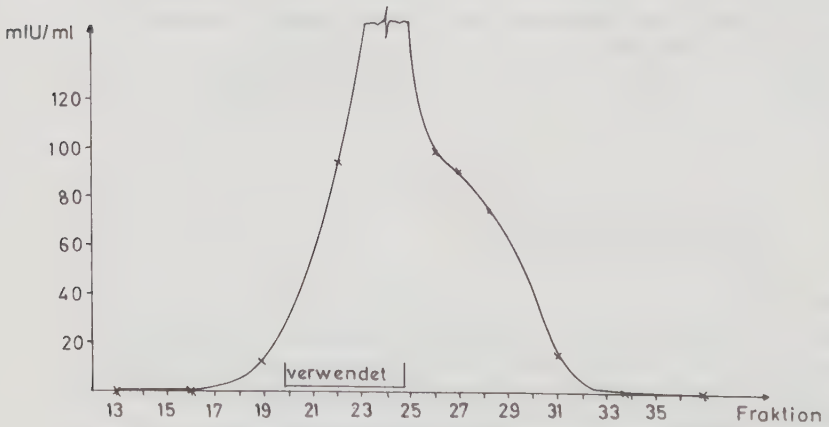

Abb.7: Antitryptische Aktivität der einzelnen Fraktionen nach Filtration auf Sephadex G 100.

2.7. Ergebnis

Mit dieser schnellen Methode konnten aus 2 l Rinderserum 11 000 mIU ITI gewonnen werden. Die Ausbeute ist also in etwa vergleichbar mit der bei exakterer, aber langwierigerer Gewinnung. Es zeigte sich daneben, daß bei dieser Art der Gewinnung praktisch kein Spontanzerfall auftritt. Dies ist vielleicht auf den extremeren pH bei dieser Elution zurückzuführen, der bakterielle und/oder Serumproteasen denaturiert.

3. Inkubation von ITI mit verschiedenen Gewebsarten

3.1. Präparation der Gewebe

Die verschiedenen Gewebe vom Rind wurden mir freundlicherweise von den Tierärzten des Münchener Schlachthofes zur Verfügung gestellt. Sie alle wurden zunächst mit einem Skalpell grob zerkleinert, wobei oberflächliche derbe Kapseln abpräpariert wurden, um den Gehalt an Faserstoffen möglichst gering zu halten. Danach wurden die Gewebsbrocken mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt und fein zerkleinert. Diese erhaltene Gewebsflüssigkeit wurde nun 10 Minuten bei 3 000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment mit etwa einem Liter physiologischer Kochsalzlösung erneut aufgerührt und zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis der Überstand klar war. Damit sollte erreicht werden, daß Fettsubstanzen und besonders das im Gewebe noch vorhandene Blut und damit auch die Serumproteine (Alpha-1 Antitrypsin!) entfernt wurden. Das Sediment wurde dann in wenig physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und mechanisch homogenisiert. Die erhaltene Lösung wurde nun bei 18 000 Upm 20 min lang zentrifugiert. Dann wurde der Überstand, im Folgenden als "Zellsaft" bezeichnet, abgegossen und das Sediment, im Folgenden als "Zelltrümmer" bezeichnet, in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, wobei das Volumen des Überstandes und das der zugefügten Kochsalzlösung gleich war, sodaß die Konzentration des Sediments unverändert und dem Zellsaft vergleichbar war.

3.2. Vorbereitung der Testansätze

Zur Inkubation des ITI mit den verschiedenen Gewebsproben, die bei 37°C im Wasserbad erfolgte, wurden folgende Testansätze vorbereitet:

I. Jeweils gleiche Menge von Zellsaft und ITI-Lösung.

II. Zellsaft und gleiche Menge 0,1 M Tris-Puffer. Dieser Testansatz würde den Zuwachs einer eventuell vorhandenen säurestabilen Inhibitoraktivität aufzeigen.

III. Jeweils gleiche Menge Zelltrümmer und ITI-Lösung.

IV. Zelltrümmer und gleiche Menge Tris-Puffer.

V. ITI-Lösung und gleiche Menge Tris-Puffer. Dieser Ansatz zeigt, inwieweit ITI im Inkubationszeitraum spontan zerfällt. In diesem Ansatz wird der Tris-Puffer nicht wie bei den anderen Ansätzen 1 : 1 verdünnt.

Diese 5 Ansätze wurden nun in das Wasserbad gegeben. Während der Inkubation wurden die Gefäße mit einer Plastikfolie verschlossen, um Wasserabdunstung zu vermeiden. Zu den im Folgenden im einzelnen beschriebenen Zeiten wurden aus jedem Ansatz 2 ml entnommen, mit 0,2 ml Perchlorsäure (70%) denaturiert und nach 15 Minuten bei 4 000 Upm 5 min lang zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen, mit 5 N Natronlauge neutralisiert und im Trypsin-Hemmtest auf antitryptische Aktivität getestet.
Um die zu Beginn der Inkubation vorhandene säurestabile inhibitorische Aktivität zu erfassen, wurde ähnlich vorgegangen: Es wurden 0,2 ml Perchlorsäure vorgegeben und dann wie oben pipettiert, mit dem Unterschied, daß für die Nullwerte jeweils 1 ml der verschiedenen Lösungen zugegeben wurde.
Da für jede Gewebeart 5 Entnahmen von je 2 ml vorgesehen waren, ergab sich das in Abb.8 dargestellte Pipettierschema.

	I	II	III	IV	V
Zellsaft	6(1)	6(1)			
Zelltrümmer			6(1)	6(1)	
ITI-Lösung	6(1)		6(1)		6(1)
Tris-Puffer		6(1)		6(1)	6(1)

Abb.8: Pipettierschema für die Inkubationsansätze in ml. Die in Klammern angegebenen Zahlen bezeichnen die Mengen für die Nullwerte.

Da die ITI-Lösung für jeden Versuch neu hergestellt werden musste, mußte auch zu jedem Versuch neu gezeigt werden, wieviel antitryptische Aktivität mit Trypsin freilegbar war. Dazu wurde, da etwa eine Aktivität von 200 mIU/ml erwartet war, 0,5 mg Trypsin (doppelter Überschuß) in 1 ml Tris-Puffer gelöst, 1 ml ITI-Lösung zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde mit 0,2 ml Perchlorsäure gefällt und wie oben beschrieben weiter vogegangen. Da hier, wie bei den Testansätzen, die ITI-Lösung im Verhältnis 1 : 1 verdünnt wurde, konnten die erhaltenen Ergebnisse ohne Umrechnung als maximal mit Trypsin freilegbare antitryptische Aktivität - auch in den Testansätzen - angesehen werden.

Für die Auswertung der Versuche wurden folgende Überlegungen angestellt: Um zeigen zu können, daß im Zellsaft bzw. in den Zelltrümmern eines Gewebes ein Enzym vorhanden ist, das aus dem ITI ein säurestabiles Inhibitormolekül freisetzen kann, muß die Differenz (in mIU/ml) im Inkubationszeitraum aus Ansatz I bzw. III signifikant höher sein, als die Differenz aus Ansatz II bzw. IV und Ansatz V zusammen. Dies bedeutet, daß Spontanzerfall und der im Zellsaft oder in Zelltrümmer eventuell vorkommende Zuwachs

an säurestabiler antitryptischer Aktivität zusammen kleiner sein müssen, als die Differenz zum Zeitpunkt O und zum Ende der Inkubation in den Ansätzen mit ITI.
Unter diesen Gesichtspunkten und nach dieser Methode wurden alle folgenden Gewebsansätze durchgeführt und ausgewertet.

3.3. Die Gewebsversuche im Einzelnen

3.3.1. Gewebsart: Rinderniere

Etwa 300 g Rinderniere wurden verwendet und zur Homogenisation in 300 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Die Inkubationsdauer betrug insgesamt 23 Stunden, Entnahmen erfolgten nach 1, 5, 9, und 23 Stunden.
Mit Trypsin waren aus der hier verwendeten ITI-Lösung 130 mIU/ml säurestabile Aktivität freilegbar.
Nach 23 Stunden wurden im ITI-Ansatz mit Zellsaft (I) 18 mIU/ml Anstieg gemessen, im ITI-Ansatz mit Zelltrümmer (III) 25 mIU/ml. Der Spontanzerfall des ITI (V) betrug im Inkubationszeitraum 15 mIU/ml.
Der Anstieg von inhibitorischer Aktivität betrug bei Zellsaft allein (II) 4, bei Zelltrümmer allein 2 mIU/ml.
Daraus errechnet sich ein realer Zuwachs von 8 mIU/ml für den Ansatz mit Zelltrümmer, im Ansatz mit Zellsaft konnte kein realer Anstieg nachgewiesen werden. Die Abb.9 zeigt in graphischer Darstellung alle Meßwerte und die zugehörigen Hemmkurven.

Wie aus Hemmkurven, Meßpunkten und obigen Ausführungen zu entnehmen ist, sind in 23 Stunden nur durch Zelltrümmer nur 8 mIU/ml real freigesetzt worden, während eine Aktivität von mindestens 90 mIU/ml am Schluß der Inkubation im Ansatz noch vorhanden wa-

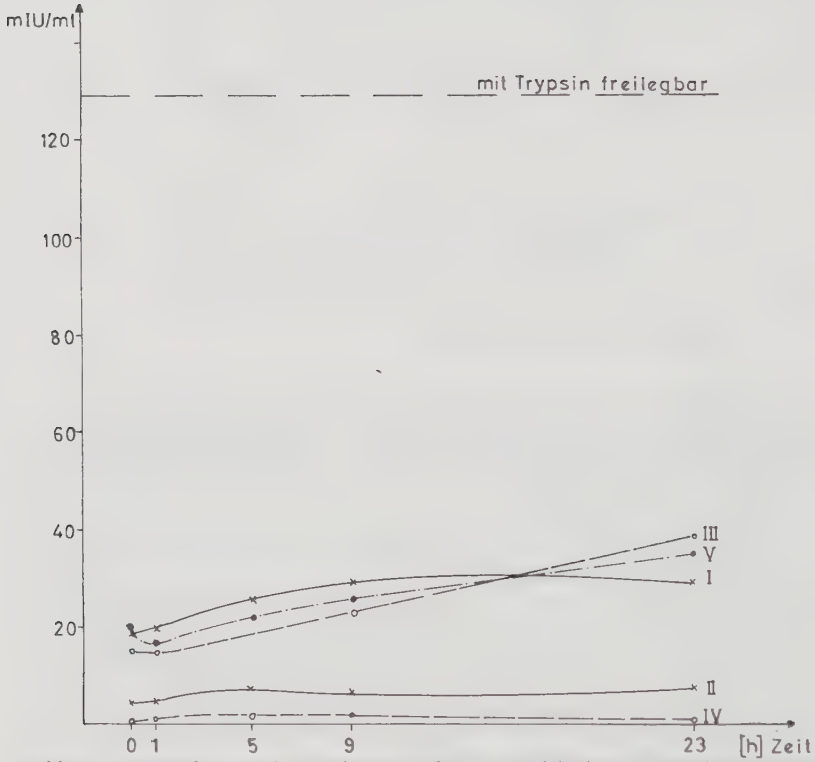

Abb.9: Meßpunkte und Hemmkurven der verschiedenen Gewebsansätze mit Rinderniere. I: Zellsaft + ITI; II: Zellsaft + Puffer; III: Zelltrümmer + ITI; IV: Zelltrümmer + Puffer; V: ITI + Puffer.

ren. Es ist also wohl eher anzunehmen, daß 8 mIU/ml im Fehlerbereich liegen und in der Niere kein ITI-freilegendes Enzym vorhanden ist.

3.3.2. Gewebsart: Rinderlunge

Bei der Präparation des Lungengewebes wurde versucht, die Pleura abzupräparieren; dies gelang jedoch nur teilweise, deshalb enthielt die Gewebslösung einen hohen Anteil an Faserstoffen. Es wurden 140 g frisches Lungengewebe verarbeitet und zur Homogenisation mit 200 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Die Inkubationsdauer betrug 23 Stunden, die Entnahmen erfolgten nach 1, 4, 11, 21 und 23 Stunden.
Mit Trypsin waren aus der diesmal verwendeten ITI-Lösung wieder 130 mIU/ml säurestabile Aktivität freilegbar.
Nach 23 Stunden war im ITI-Ansatz mit Zellsaft (I) ein Anstieg von 35 mIU/ml zu verzeichnen, im ITI-Ansatz mit Zelltrümmer (III) sogar einer von 41 mIU/ml. Der Spontanzerfall des ITI betrug in 23 Stunden 23 mIU/ml.
Der Anstieg von inhibitorischer Aktivität betrug bei Zellsaft allein (II) 3, bei Zelltrümmern allein (Ansatz IV) 4 mIU/ml. Daraus errechnet sich ein realer Zuwachs von 9 mIU/ml für Zellsaft und 14 mIU/ml für Zelltrümmer. Die Abb. 10 zeigt den Verlauf der verschiedenen Hemmkurven.

Die graphische Darstellung zeigt, daß eine hohe Konzentration von säurestabiler Grundaktivität im Lungengewebe vorhanden ist. Sie ist auf das im Rinderbronchialsekret vorkommende Trasylol zurückzuführen.
Obwohl in 23 Stunden nur relativ wenig realer Zuwachs von säurestabiler antitryptischer Aktivität entsteht, und obwohl am Ende der Inkubation noch mindestens 40 mIU/ml in den ITI-Ansätzen freigesetzt hätten werden können, ist der Inhibitorzuwachs doch schon zu groß, um mit einem Meßfehler erklärt werden zu können. Wie schon eingangs (Seite 2) erwähnt, wurde früher angenommen, daß das Flimmerepithel des Respirationstrakts aus dem ITI ein spezifisches säurestabiles Inhibitormolekül freisetzen kann. Das vorliegende Ergebnis scheint diese Vermutung zu bestärken.

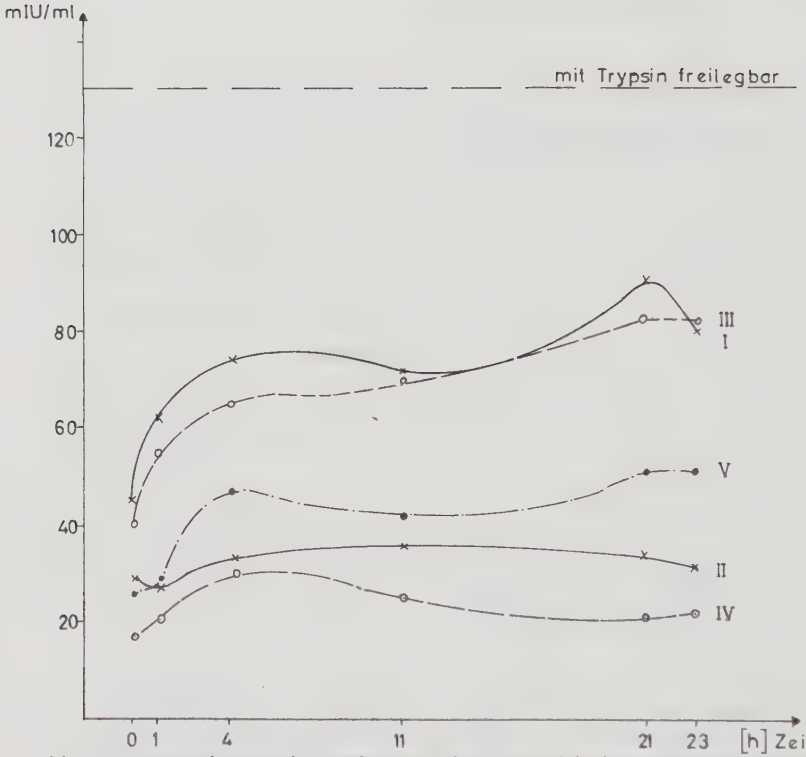

Abb.10: Meßpunkte und Hemmkurven der verschiedenen Ansätze mit Rinderlunge. I: Zellsaft + ITI; II: Zellsaft + Puffer; III: Zelltrümmer + ITI; IV: Zelltrümmer + Puffer; V: ITI + Puffer.

3.3.3. Gewebsart: Speicheldrüse

120 g Gewebe einer Glandula sublinqualis wurde zerkleinert und zur Homogenisation mit 300 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Die Inkubationsdauer betrug insgesamt 25 Stunden, Entnah-

men erfolgten nach 1, 7, 12, 22 und 25 Stunden.
Aus der verwendeten ITI-Lösung waren mit Trypsin maximal 90 mIU/ml säurestabile inhibitorische Aktivität freilegbar.
Nach 25 Stunden wurden im ITI-Ansatz mit Zellsaft (I) 7, in dem mit Zelltrümmer (III) 12 mIU/ml Anstieg gemessen. Der ITI-Spontanzerfall (V) betrug insgesamt 8 mIU/ml. Der Zuwachs an antitryptischer Aktivität machte bei Zellsaft allein (II) 3, bei Zelltrümmern allein(IV) 2 mIU/ml aus.
Daraus errechnet sich ein realer Zuwachs von 2 mIU/ml, für Zellsaft konnte kein realer Zuwachs festgestellt werden.
Wie auch aus den Hemmkurven, die in Abb. 11 schematisch dargestellt sind, zu entnehmen ist, zeigt sich kein Anhaltspunkt für eine enzymatische Freilegung säurestabiler Inhibitoren.

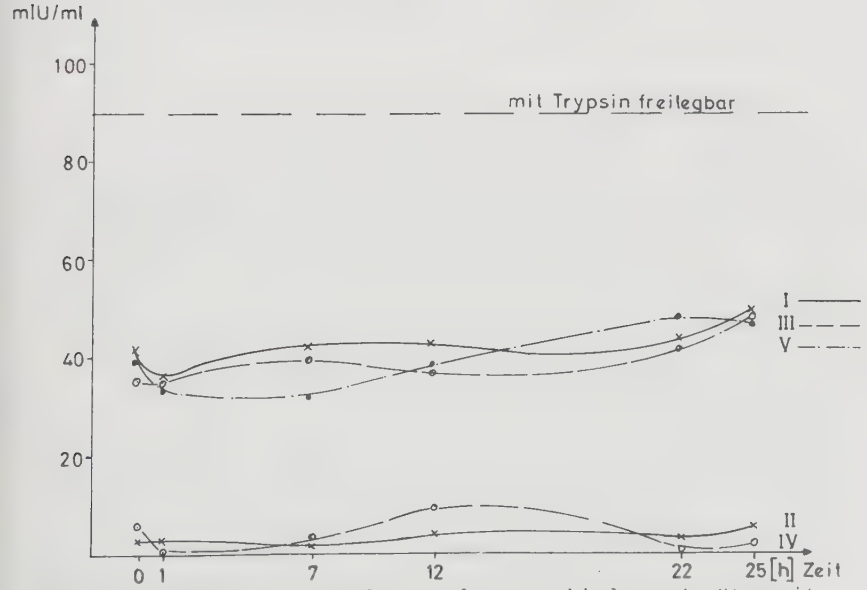

Abb.11: Meßpunkte und Hemmkurven der verschiedenen Ansätze mit Glandula sublnqualis. I: Zellsaft + ITI; II: Zellsaft + Puffer; III: Zelltrümmer + ITI; IV: Zelltrümmer + Puffer; V: ITI + Puffer.

3.3.4. Gewebsart: Bauchspeicheldrüse

80 g Pankreasgewebe wurden verarbeitet und nach der letzten Zentrifugation mit 200 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt; dann erfolgte Homogenisation. Die Ansätze wurden 23 Stunden inkubiert, die Entnahmen erfolgten nach 1, 5, 10 und 23 Stunden. Mit Trypsin waren 98 mIU/ml säurestabiler Aktivität aus der verwendeten ITI-Lösung freilegbar.
Nach 23 Stunden wurden im ITI-Ansatz mit Zellsaft (I) 50, in dem mit Zelltrümmer (III) 31 mIU/ml Anstieg gemessen; der Spontanzerfall (V) der ITI-Lösung betrug im Inkubationszeitraum 6 mIU/ml. Ein Zuwachs von 5 mIU/ml inhibitorischer Aktivität zeigte sich bei Zellsaft allein (II), einer von 6 mIU/ml bei Zelltrümmern (IV). Daraus errechnet sich ein realer Zuwachs von 39 mIU/ml im Zellsaft, und von 19 mIU/ml für Zelltrümmer. Den genauen zeitlichen Verlauf des Anstiegs von antitryptischer Aktivität zeigt die Abbildung 12.

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, war im Ansatz mit Zellsaft schon nach 10 Stunden die mit Trypsin freisetzbare Menge an säurestabilem Inhibitor entstanden.
Da es sich jedoch hier um Pankreasgewebe handelt, in dem die Vorstufen der Verdauungsenzyme wie Trypsinogen usw.produziert werden, lag der Verdacht nahe, daß das ITI-freisetzende Enzym hier Trypsin ist. Dies konnte durch einen Test mit BAPA wahrscheinlich gemacht werden: Zu 1 ml BAPA wurden 2 ml Pankreaszellsaft gegeben und die Extinktion im Photometer verfolgt. Dabei zeigte sich eine langsame, kontinuierliche Extinktionssteigerung, d. h. BAPA wurde gespalten.

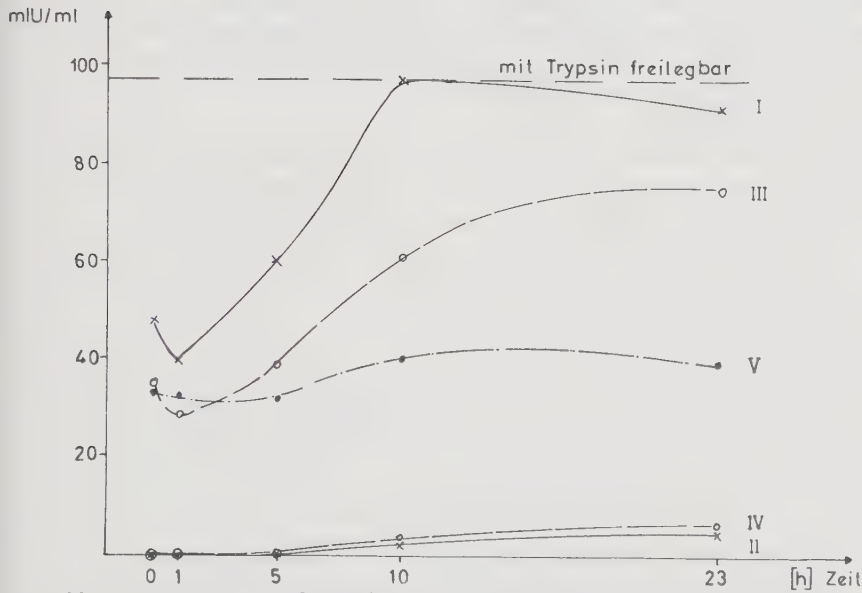

Abb.12: Meßwerte und Hemmkurven der verschiedenen Ansätze mit Pankreasgewebe. I: Zellsaft + ITI; II: Zellsaft + Puffer; III: Zelltrümmer + ITI; IV: Zelltrümmer + Puffer; V: ITI + Puffer.

3.3.5. Gewebsart: Leber

Es wurden 170 g frisches Lebergewebe verwendet und zur Homogenisation in 250 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Die Inkubationsdauer betrug insgesamt 23 Stunden, Entnahmen erfolgten nach 1, 4, 10 und 23 Stunden.
Aus der verwendeten ITI-Lösung waren mit Trypsin 85 mIU/ml säurestabile Aktivität freilegbar.

Nach 23 Stunden wurden im Ansatz mit Zellsaft (I) 30, in dem mit Zelltrümmer (II) 35 mIU/ml Anstieg gefunden. Nach 23 Stunden zeigte sich, daß der Ansatz mit ITI und Puffer (V) 15 mIU/ml mehr säurestabile inhibitorische Aktivität enthielt als zu Beginn. In den Ansätzen ohne ITI zeigte sich kaum eine Zunahme inhibitorischer Aktivität, sie betrug für Zellsaft (II) 2, für Zelltrümmer (IV) 1 mIU/ml.
Daraus errechnet sich ein realer Zuwachs von 13 mIU/ml für den Ansatz mit Zellsaft und einer von 19 mIU/ml für Zelltrümmer.
Abb. 13 zeigt den Verlauf der verschiedenen Hemmkurven.

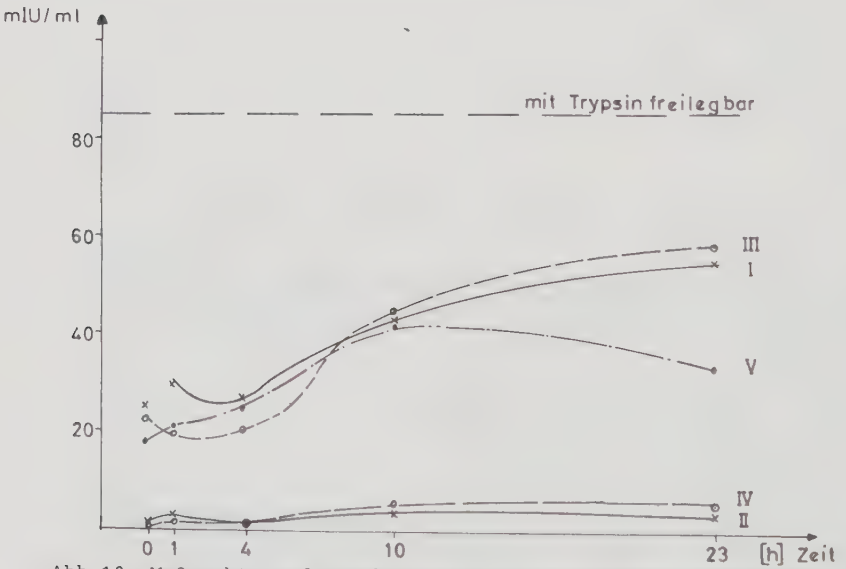

Abb.13: Meßpunkte und Hemmkurven der verschiedenen Ansätze mit Rinderleber. I: Zellsaft + ITI; II: Zellsaft + Puffer; III: Zelltrümmer + ITI; IV: Zelltrümmer + Puffer; V: ITI + Puffer.

Hier gilt ebenso wie bei Lungengewebe: Der Zuwachs an inhibitorischer Aktivität ist zu groß, um mit einem Meßfehler erklärt werden zu können. Er ist aber auch nicht groß genug, um annehmen zu können, daß ein ITI-spaltendes Enzym in den eigentlichen Hepatocyten, der Hauptmenge der Zellen im Organ Leber, vorkommt.

3.3.6. Gewebsart: Milz

Von etwa einer halben Rindermilz wurde die Kapsel abpräpariert und die verbleibenden 90 g Gewebe nach Zerkleinerung und Zentrifugation zur Homogenisation in 200 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Die einzelnen Ansätze wurden insgesamt 22 Stunden inkubiert, wobei nach1, 5, 10 und 22 Stunden je 2 ml Probe entnommen wurden.
Mit Trypsin waren aus der bei diesem Versuch verwendeten ITI-Lösung 100 mIU/ml Inhibitoraktivität freilegbar.
Nach 22 Stunden wurden im ITI-Ansatz mit Zellsaft (I) 50, in dem mit Zelltrümmer (III) 60 mIU/ml Anstieg gemessen. Der Spontanzerfall des ITI (V) betrug im Inkubationszeitraum 13 mIU/ml.
In den Ansätzen ohne ITI zeigte sich ein Zuwachs von 10 mIU/ml im Zellsaft (II), bei den Zelltrümmern (IV) konnte kein Zuwachs festgestellt werden.
Daraus errechnet sich ein realer Anstieg säurestabiler Inhibitoren für den Zellsaft von 37, für die Zelltrümmer von 47 mIU/ml.
In Abb. 14 ist der zeitliche Verlauf des Anstiegs in den einzelnen Ansätzen wiedergegeben.

Sowohl aus den oben errechneten Zahlen des realen Zuwachses der säurestabilen Inhibitoren, als auch aus dem Verlauf der Hemmkurven geht deutlich hervor, daß bei diesem Versuch eine enzymatische Spaltung des ITI in ein säurestabiles Inhibitormolekül stattgefunden hat.

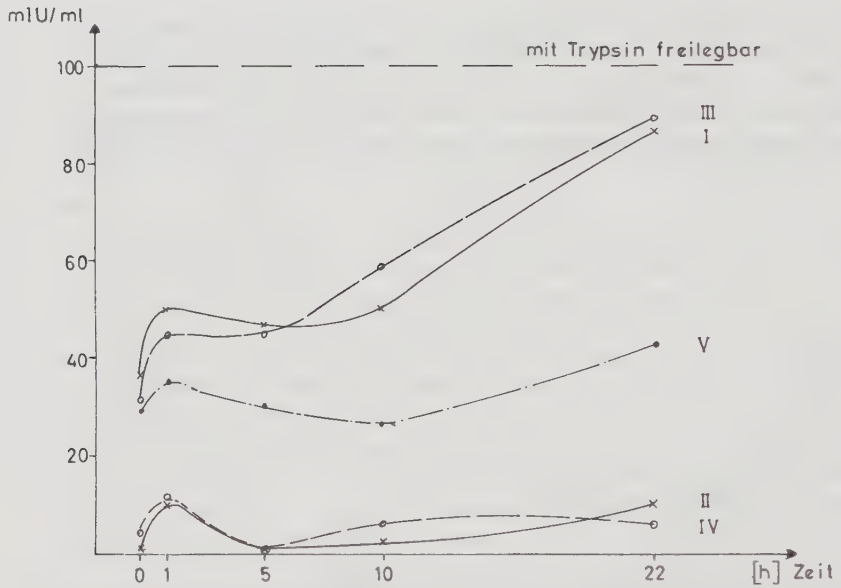

Abb.14: Meßpunkte und Hemmkurven der verschiedenen Ansätze mit Mizgewebe. I: Zellsaft + ITI; II: Zellsaft + Puffer; III: Zelltrümmer + ITI; IV: Zelltrümmer + Puffer; V: ITI + Puffer.

3.3.7. Gewebsart: Lymphknoten

Die hier verwendeten Lymphknoten stammten aus dem paraaortalen Bereich. Es wurden 130 g dieses Gewebes zerkleinert, doch zeigte sich bei den einzelnen Zentrifugationen, daß sehr viel Fettgewebe enthalten war, sodaß die obige Gewichtsangabe nicht mehr übereinstimmt mit dem Gewicht der Gewebsstückchen, die in 150 ml physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert wurden.
Die Inkubationsdauer betrug insgesamt 25 Stunden, Proben wurden

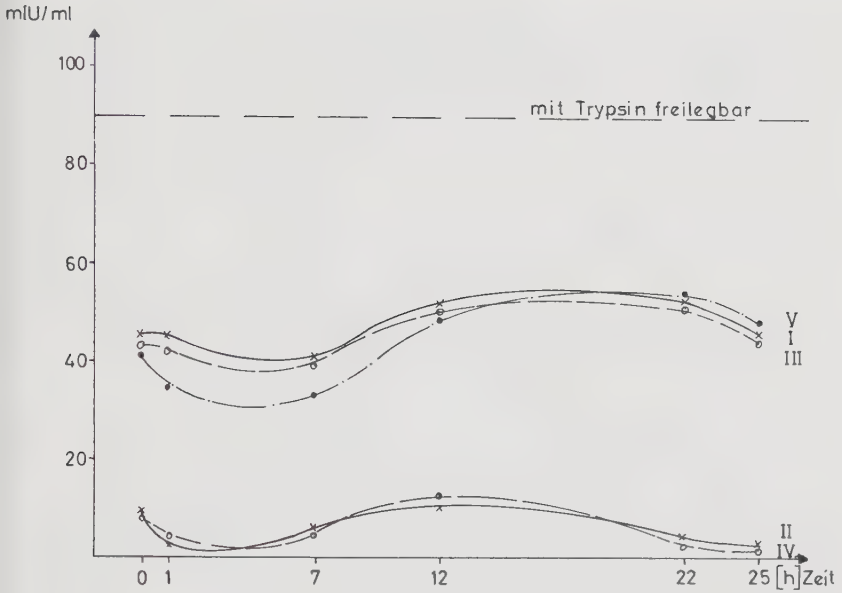

Abb.15: Meßpunkte und Hemmkurven der verschiedenen Ansätze mit Lymphknoten. I: Zellsaft + ITI; II: Zellsaft + Puffer; III: Zelltrümmer + ITI; IV: Zelltrümmer + Puffer; V: ITI + Puffer.

nach 1, 7, 12, 22 und 25 Stunden entnommen.
Aus der verwendeten ITI-Lösung wurden bei Behandlung mit Trypsin 90 mIU/ml säurestabile Inhibitoren frei.
Nach 25 Stunden zeigte sich im ITI-Ansatz mit Zellsaft kein, in dem mit Zelltrümmer ein Anstieg von 1 mIU/ml. Der Ansatz ITI + Puffer zeigte mit einem Anstieg von 6 mIU/ml den größten Zuwachs an säurestabiler Aktivität.
Weder bei Zellsaft noch bei Zelltrümmer allein (Ansätze II und IV) zeigte sich ein meßbarer Zuwachs antitryptischer Aktivität. Daraus ergibt sich, daß weder Zellsaft noch Zelltrümmer einen re-

alen Zuwachs zu verzeichnen haben; es scheint eher das Gegenteil der Fall zu sein: ITI wird in diesen Ansätzen stabilisiert. Die Abbildung 15 zeigt die Hemmkurven der verschiedenen Ansätze mit Lymphknotengewebe.

3.3.8. Andere Gewebe

Aus systematischen Gründen sollte noch versucht werden, Muskelgewebe in oben beschriebener Weise zu testen. Dies erwies sich jedoch, zumindest mit den vorhandenen Geräten, als unmöglich, da Muskelgewebe aufgrund seines Faserreichtums nicht homogenisierbar war. Weiterhin sollte versucht werden, Gewebe, die in direktem Kontakt zum Intravasalraum stehen zu testen. Dazu wurde ein Stück aus der Aorta abdominalis und des Herzmuskels mit Endokard präpariert. Es erwies sich jedoch aus dem gleichen Grund wie oben als unmöglich, diese Gewebe zu testen.

3.4. Ergebnis

In folgenden getesteten Organproben ergab sich kein Anhaltspunkt für ein ITI-freisetzendes Enzym: Niere, Glandula sublinqualis und Lymphknoten.
Das Lungengewebe für diesen Versuch, das aus dem Bereich der Basis stammte, setzte nicht sehr viel säurestabilen Inhibitor aus dem Inter-alpha-Trypsin Inhibitor frei. Es bleibt weiteren Untersuchungen mit Lungengewebe aus dem Bereich der Hili überlassen, zu zeigen, ob der Bronchialsekretinhibitor aus dem ITI entsteht.
Die Inkubation des Pankreasgewebes mit ITI zeigte schon nach 10

Stunden die gleiche säurestabile antitryptische Aktivität, die auch mit Trypsin erreicht werden konnte. Es konnte aber auch nachgewiesen werden, daß Pankreaszellsaft BAPA spaltet; dies und die Tatsache, daß Trypsinogen im Pankreas synthetisiert wid, machen es wahrscheinlich, daß es sich bei diesem freilegenden Enzym um Trypsin handelt.

Die Freisetzung durch das Lebergewebe ist zwar nicht sehr hoch, aber zu hoch, um mit einem Meßfehler erklärt werden zu können. Wenn es sich aber hier um eine enzymatische Freisetzung handelt, gibt es zwei Möglichkeiten, sie zu erklären:

1. Das Enzym katalysiert nur sehr langsam, es hat also für die hier behandelte Reaktion eine nur geringe Spezifität.
2. Das Enzym ist in der Leber in nur geringer Konzentration vorhanden, weil es nicht in den Hepatocyten vorkommt, sondern einer Zellart angehört, die zwar physiologischerweise in der Leber vorkommt, jedoch mengenmäßig weit hinter den Hepatocyten zurückbleibt.

Es wurde in diesem Zusammenhang an ein Enzym aus den v. Kupfferschen Sternzellen, die zum retikulohistiocytären System gehören, gedacht. Dies besonders, nachdem sich gezeigt hatte, daß im Milzgewebe ein freisetzendes Enzym vorhanden ist.

Um festzustellen, ob vielleicht noch weitere Gewebe existieren, die sowohl aus dem ITI einen säurestabilen Inhibitor freilegen, als auch zum retikulohistiocytären System gehören, wurde ein Freilegungsversuch mit Lymphknotengewebe gemacht. Dabei zeigte sich jedoch keine nachweisbare Freilegung eines säurestabilen Inhibitors.

4. Genauere Charakterisierung eines freilegenden Enzyms

Im Abschnitt 3 dieser Arbeit wurden verschiedene Gewebsarten mit Rinder-ITI inkubiert und mittels Trypsin-Hemmtest die Entstehung von säurestabilen Inhibitoren verfolgt. Dabei zeigten sich einige Gewebe sehr aktiv, andere sehr wenig oder nicht. Eine schematische Zusammenfassung der im Abschnitt 3 einzeln aufgeführten Ergebnisse des realen Zuwachs von säurestabiler Aktivität bei Zellsaft und Zelltrümmer der untersuchten Gewebe im jeweils angegebenen Inkubationszeitraum zeigt Abb.16.

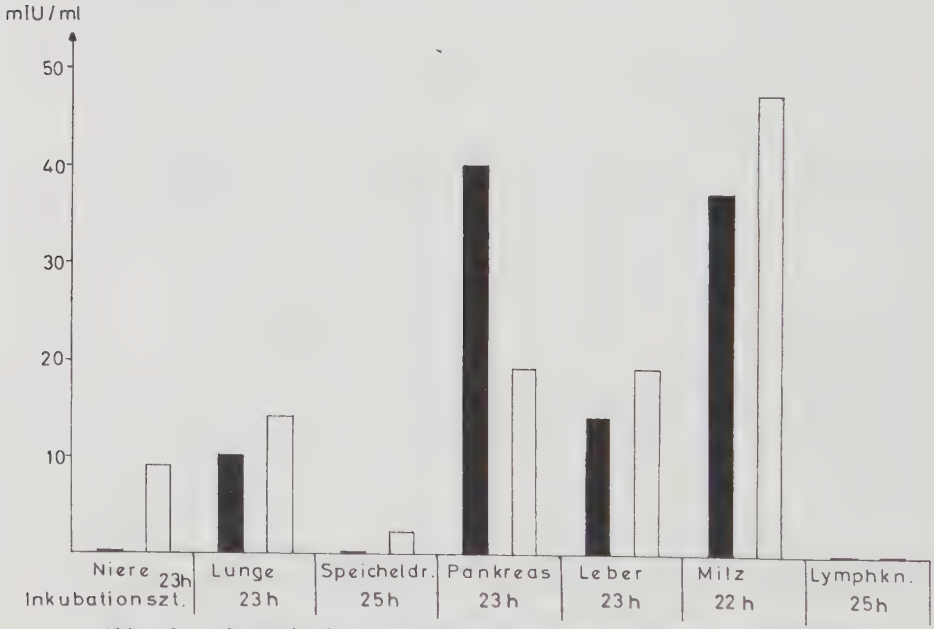

Abb.16: Schematische Aufstellung des realen Zuwachses säurestabiler Aktivität in Zellsaft (■) und Zelltrümmer (□) der angegebenen Gewebsart im angegebenen Inkubationszeitraum.

Die Abbildung zeigt, daß sowohl im Pankreas- als auch im Milzsaft ähnlich schnell säurestabile Inhibitoren freigelegt werden, nur noch übertroffen von Zelltrümmern aus Milzgewebe. Wie aus obigen Ausführungen ersichtlich ist, enthält Pankreaszellsaft Trypsin, das macht eine genauere Analyse dieses Zellsaftes unnötig. Das Milzgewebe zeigt danach die höchste freilegende Aktivität. Dies ist der Grund dafür, daß der Versuch einer genaueren Analyse und Charakterisierung eines freilegenden Enzyms mit Milzzellsaft, der leichter als Zelltrümmer zu handhaben ist, unternommen wurde.

4.1. Präparation des Milzzellsaftes

Eine ganze frische Rindermilz wurde, nachdem die derbe Kapsel abpräpariert war, mit einem Skalpell grob zerkleinert, mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt und fein zerkleinert. Diese Gewebslösung wurde dann 5 Minuten bei 4 000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit frischer Kochsalzlösung erneut aufgerührt und wieder zentrifugiert, solange, bis der Überstand klar war. Um die Cytolyse zu verbessern, wurde dann das Sediment in Aqua bidest. aufgerührt und mechanisch homogenisiert. Die so gewonnene Lösung wurde nun 10 Minuten bei 18 000 Upm und 4°C zentrifugiert, das Sediment, das den Zelltrümmern entspricht, verworfen und der Überstand weiter verwendet. Etwa 350 g Milzgewebe ergaben so ca. 800 ml Milzzellsaft.

4.2. Auftrennung der Proteine des Milzzellsaftes im Ionenaustauscher

Als Ionenaustauscher wurde wieder DEAE-Cellulose SH 23 verwendet. Die Cellulose war regeneriert und mit 0,05 M TRA-Puffer versetzt, sie hatte ein Volumen von 400 ml.
750 ml Milzsaft wurden gegen TRA-Puffer dialysiert, der Rest als Vergleichssubstanz verwahrt. Milzzellsaft und Cellulose wurden nun vereinigt, 15 min bei Zimmertemperatur gerührt und dann 5 min bei 4 000 Upm zentrifugiert. Der Überstand, im Folgenden als Durchlauf bezeichnet, hatte ein Volumen von 750 ml.
Da für die nachfolgende Testung der Proteine eine kontinuierliche Elution ungünstig erschien, wurde in Sprüngen eluiert. Verwendet wurde dazu Kochsalz und zwar in folgenden Konzentrationen: 0,2 - 0,4 - 0,6 M NaCl. Das Kochsalz wurde in TRA-Puffer gelöst. Da dieser als Hydrochlorid vorlag, gelten die Elutionsstufen: 0,05 M Cl^- = Durchlauf; 0,25 - 0,45 - 0,65 M Cl^-.
Das Sediment obiger Zentrifugation wurde noch zweimal in 1 000 ml TRA-Puffer aufgenommen und wie oben zentrifugiert. Damit sollte erreicht werden, daß die Grenzen zwischen den einzelnen Elutionsschritten relativ scharf sind.
Das Sediment wurde dann zweimal mit 500 ml TRA-Puffer + 0,2 M NaCl aufgerührt und ebenso zentrifugiert. Diese beiden Überstände wurden verwertet, eine Konzentrationsverdünnung erfolgte wiederum mit zweimal 1 000 ml der gleichen Lösung. Ebenso wurde auch die Elution mit 0,4 und 0,6 M NaCl in TRA-Puffer durchgeführt. Die Cellulose wurde also immer zweimal mit 500 ml jeder Elutionslösung aufgerührt und zentrifugiert, die hierbei erhaltenen Überstände wurden verwertet; die folgenden zweimaligen Zugaben von 1 000 ml der gleichen Elutionslösung dienten der Konzentrationsverdünnung der bei dem jeweiligen Elutionsschritt in der Cellulose verbliebenen Proteine.
Am Ende dieser Auftrennung waren also folgende Fraktionen vor-

handen:

1. 50 ml Milzzellsaft für Vergleichszwecke
2. 750 ml Durchlauf, entspricht 0,05 M Cl^-
3. 1 000 ml Überstand mit 0,25 M Cl^-
4. 1 000 ml Überstand mit 0,45 M Cl^-
5. 1 000 ml Überstand mit 0,65 M Cl^-

Diese 5 Fraktionen wurden gegen Aqua bidest. dialysiert und dann lyophilisiert, da frühere Versuche gezeigt hatten, daß Milzsaft schnell seine proteolytische Aktivität verliert.

4.3. Testung der einzelnen Eiweißfraktionen

Es ist relativ aufwendig und langwierig, mit Inter-alpha-Trypsin Inhibitor zu testen. Daher wurde ein Screening-Test gesucht, der schnell und unspezifisch Proteasenaktivität aufzeigt. Dafür schien Azocasein als unspezifisches Substrat für Proteasen gut geeignet, weil sein durch enzymatische Spaltung entstandenes Produkt quantitativ leicht meßbar ist (25).

4.3.1. Testung mit Azocasein

2 g Azocasein wurden in 100 ml TRA-Puffer gelöst. Dann wurden 10 mg jeder Eiweißfraktion abgewogen und in 1 ml TRA-Puffer gelöst. 2 ml Azocaseinlösung und 0,5 ml Proteinlösung wurden vereinigt und bei 37°C inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug eine Stunde, danach erfolgte Zugabe von 2 ml 10%iger Trichloressigsäure. Um die Extinktion zum Zeitpunkt 0 zu ermitteln, wurden

2 ml 10%ige Trichloressigsäure vorgegeben, dann 2 ml Azocaseinlösung und 0,5 ml Proteinlösung zugegeben. Nach 15 min wurden die Ansätze bei 4 000 Upm zentrifugiert und die Extinktion der Überstände im Eppendorf Photometer bei 366 nm gemessen. Die Eichung erfolgte dabei nach dem jeweils zugehörigen Nullwert. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigt Abb. 17.

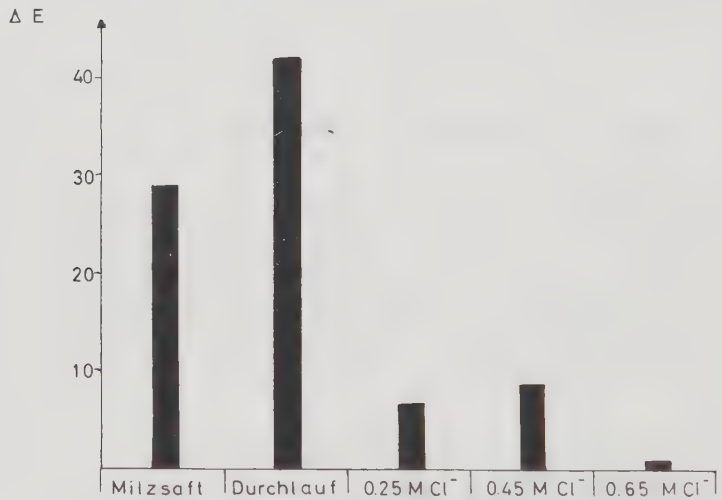

Abb.17: Extinktionsunterschied zwischen Null- und Inkubationswert bei Test der verschiedenen Eiweißfraktionen mit Azocasein bei pH 7,8.

Die Abbildung zeigt deutlich, daß die höchste Proteasenaktivität im Durchlauf vorhanden ist. Da aber diese Aktivität immer noch nicht sehr hoch ist, wurde ein weiterer Versuch mit Azocasein gemacht bei dem sich der Aufbau etwas vom obigen unterschied:

2 g Azocasein wurden in 100 ml Acetatpuffer gelöst. Da auch nach Erhitzen noch eine Trübung vorhanden war, wurde die Lösung 5 min bei 4 000 Upm zentrifugiert und nur der Überstand weiter verwendet. Dann wurden jeweils 100 mg der lyophilisierten Eiweißfraktionen abgewogen und in 3,5 ml des gleichen Puffers gelöst. Auch hier zeigte sich eine Trübung, deswegen erfolgte auch hier Zentrifugation wie oben.
Nun wurde für die Nullwerte zu 1,5 ml Trichloressigsäure 3 ml Azocaseinlösung und 1 ml Enzymlösung gegeben.
Für die Inkubationsansätze wurden 3 ml Azocaseinlösung und 1 ml Enzymlösung zusammengegeben und im Wasserbad bei 37°C 3 Stunden inkubiert, Proteinfällung erfolgte dann mit 1,5 ml Trichloressigsäure. Nach 15 min wurden die Ansätze wie beschrieben zentrifugiert und die Überstände mit einer Pipette abgenommen; Messung erfolgte wie oben, die Ergebnisse sind in Abb.18 schematisch dargestellt.

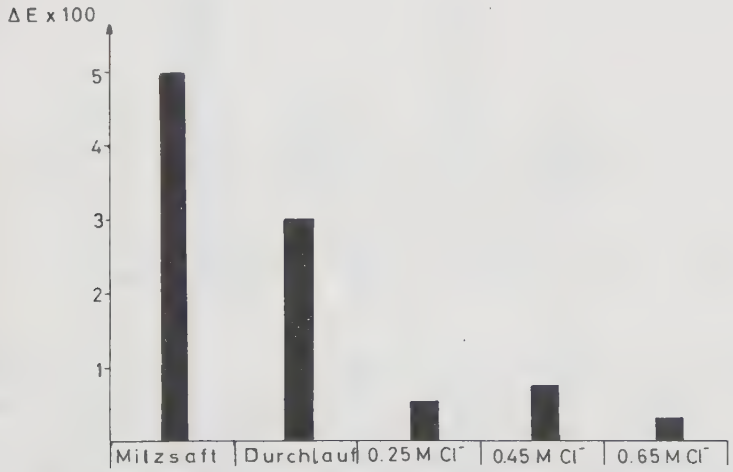

Abb.18: Extinktionsdifferenz zwischen Null- und Inkubationswert bei Test der verschiedenen Eiweißfraktionen mit Azocasein bei pH 5.

Auch diese Abbildung läßt erkennen, daß eine sehr starke Proteasenaktivität im Durchlauf vorhanden ist. Es zeigt sich aber auch wie im Azocaseintest bei pH 7,8 eine weitere, allerdings viel geringere Aktivität in der Fraktion 0,45 M Cl^-. Die hier sehr viel höhere Extinktionsdifferenz ist z. T. auf längere Inkubationsdauer und höhere Enzymkonzentration zurückzuführen. Beide Azocaseintests liefern also hinsichtlich der einzelnen Milzfraktionen das gleiche Ergebnis, der Milzsaft jedoch zeigt im Sauren sehr viel höhere Proteasenaktivität.
Der Azocaseintest ist ein sehr unspezifischer Suchtest für Proteasen. Man kann also nicht rückschließen auf ein bestimmtes gesuchtes Enzym wenn mehrere Azocaseintests positiv sind. Da in diesem Fall anscheinend zwei mögliche Proteasen vorliegen, ist es unumgänglich, die einzelnen Fraktionen nun mit Inter-alpha--Trypsin Inhibitor zu untersuchen.

4.3.2. Tests mit ITI

Für diese Tests wurde Human-ITI verwendet, da nur für diesen ein Antiserum vorhanden und damit eine immunelektrophoretische Kontrolle möglich war. Zunächst wurde ein Test mit TRA-Puffer durchgeführt, d. h. bei pH 7,8.
Dazu wurde das ITI-Konzentrat 1 : 10 mit TRA-Puffer verdünnt. Nach einer Behandlung mit Trypsin im Überschuß konnte mittels Hemmtest nachgewiesen werden, daß etwa 100 mIU/ml freilegbar waren.
Es wurden nun 100 mg jeder Eiweißfraktion in 3,5 ml TRA-Puffer gelöst. Zu 1 ml ITI-Lösung wurden je 0,25 ml Enzymlösung gegeben, dann erfolgte die Inkubation bei 37°C im Wasserbad über 26 Stunden. Die Reaktion wurde beendet durch Zugabe von 100 ul Perchlorsäure. Nach 15 min wurde zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit 5 N Natronlauge neutralisiert und im Trypsin-Hemm-

test gemessen. Die Abbildung 19 zeigt den Gehalt an säurestabiler Aktivität in den einzelnen Fraktionen. Der ITI-Spontanzerfall betrug im Inkubationszeitraum 6 mIU/ml.

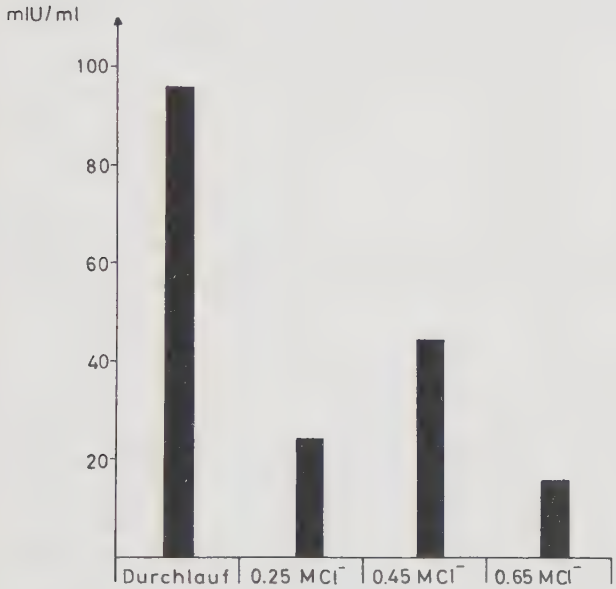

Abb. 19: Gehalt an säurestabiler antitryptischer Aktivität der Fraktionen nach 26-stündiger Inkubation mit Human-ITI.

Hier zeigt sich, daß in 26 Stunden praktisch der gesamte vorhandene ITI durch ein Enzym aus dem Durchlauf gespalten worden ist; es zeigt sich auch, daß in der 0,45 M Cl^-- Fraktion ein nicht so aktives ITI-spaltendes Enzym vorhanden ist. Diese Ergebnisse stimmen sehr genau mit denen überein, die aus den Azocaseintests gewonnen wurden.

Um festzustellen, ob diese Übereinstimmung auch bei saurem pH gilt, wurde ITI, 1 : 10 verdünnt, 100 mg jeder Eiweißfraktion in 3,5 ml Acetat-Puffer gelöst, die Trübung abzentrifugiert und dann weiter wie oben vorgegangen. Das Mischungsverhältnis von ITI- zu Enzymlösung war mit 4 : 1 das gleiche wie im obigen Versuch, sodaß die Ergebnisse vergleichbar sind. Wie Abb. 20 zeigt, wurden hier 4 Messungen zu verschiedenen Zeiten gemacht.

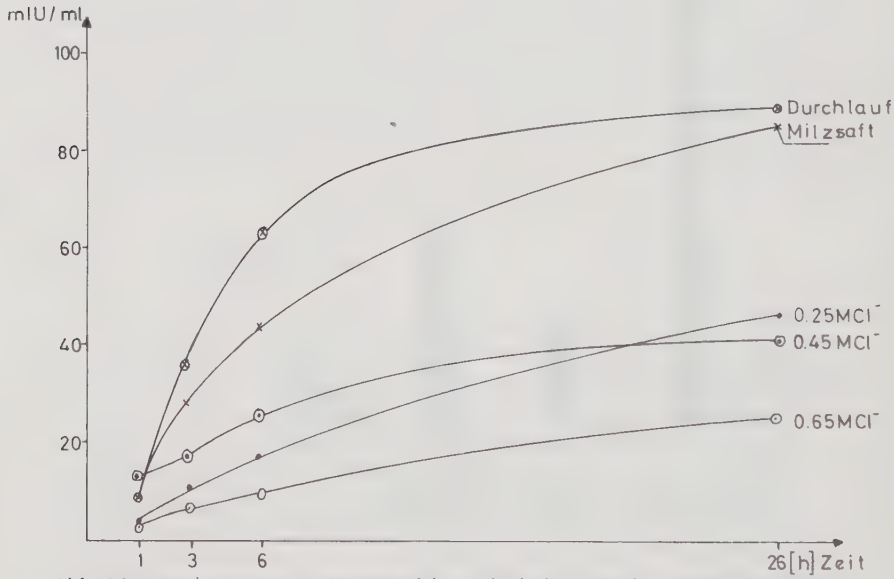

Abb.20: Freigesetzte säurestabile Aktivität bei Inkubation der Milzeiweißfraktionen mit Human-ITI bei saurem pH zu verschiedenen Zeitpunkten.

Diese Abbildung zeigt zunächst, daß auch hier nach 26 Stunden der gesamte ITI in den Fraktionen Milzsaft und Durchlauf gespalten worden ist. Die Form der Kurve des Durchlaufs läßt erkennen,

daß die Reaktion eigentlich schon vor Ablauf der 26 Stunden abgeschlossen war. Es zeigt sich daneben auch, daß die Fraktion 0,45 M Cl^- im Verhältnis zur Fraktion 0,25 M Cl^- nicht mehr so aktiv ist wie im alkalischen Bereich. Absolut jedoch sind die Ergebnisse ähnlich: 41 mIU/ml im Sauren bzw. 44 mIU/ml im Alkalischen. Das pH-Optimum für diese Fraktion liegt also etwa in der Mitte zwischen 5 und 8.
Die relativ hohe Freisetzung säurestabiler Inhibitoren in der Fraktion 0,25 M Cl^- beruht wohl auf der nicht ganz scharfen Trennung der Proteine bei der Elution, sodaß ein gewisser Anteil von Durchlaufproteinen in dieser Fraktion vorhanden ist. Wenn dies real ist, ergibt sich, daß die ITI-spaltende Protease des Durchlaufs bei saurem pH aktiver ist als im alkalischen Bereich: Bei einer Inkubationsdauer von 26 Stunden zeigte die Fraktion 0,25 M eine säurestabile Aktivität von 24 mIU/ml im Alkalischen, aber von 46 mIU/ml im Sauren.
Die Ergebnisse aller Tests kann man wie folgt zusammenfassen: Nach schrittweiser Elution von Milzzellsaft auf einem Ionenaustauscher wurden vier verschiedene Eiweißfraktionen gewonnen. Zwei dieser Fraktionen zeigten ITI-Spaltung. Eine der Fraktionen, der sogenannte Durchlauf ist wahrscheinlich im Sauren aktiver, die andere, die mit 0,45 M Cl^- eluiert worden war, hat ein pH--Optimum im Bereich zwischen 5 und 8. Die Ergebnisse, die die Versuche mit Azocasein erbrachten, stimmen mit denen der ITI-tests überein, sie zeigten keinen Anhalt für weitere Proteasen in anderen Fraktionen.
Die Azocaseintests zeigten, daß der Durchlauf die höchste Proteasenaktivität aufweist, und die ITI-Tests ergaben, daß auch ITI von dieser Fraktion am schnellsten gespalten wird. Deshalb wurden die weiteren Versuche nur mit der als Durchlauf bezeichneten Fraktion fortgeführt.

4.4. Charakterisierung des ITI-spaltenden Enzyms aus dem Durchlauf

4.4.1. pH-Optimum

Zunächst wurde angenommen, daß das gesuchte Enzym im Bereich zwischen pH 4 und 8 sein Optimum hat. Um jeweils einen bestmmten pH konstant zu halten, wurden für pH 4 bis 8 verschiedene Puffer hergestellt: Für pH 4 und 5 fand 0,2 M Acetatpuffer, der mit 30%iger Essigsäure auf die genannten pH-Werte eingestellt war, Verwendung; für pH 6, 7 und 8 wurde 0,2 M TRA-Puffer, mit 2 N NaOH auf die entsprechenden Werte eingestellt, verwendet.
Nun wurden zu je 3,5 ml der 5 verschiedenen Puffer 100 mg des lyophilisierten Durchlaufproteins gegeben; da sich hier teilweise eine Trübung zeigte, wurde 5 min bei 4 000 Upm zentrifugiert. Zu je 1 ml Überstand wurden nun 4 ml ITI, 1 : 10 mit dem entsprechenden Puffer verdünnt, zugegeben. Die 5 Testansätze wurden nun bei 37°C im Wasserbad inkubiert, Entnahmen erfolgten nach 15 min, nach 3,25 und 7,25 Stunden. Es wurde jeweils 1 ml aus dem Testansatz entnommen, mit 100 ul Perchlorsäure gefällt, nach 15 min 5 Minuten bei 4 000 Upm zentrifugiert, der Überstand mit 5 N Natronlauge neutralisiert und im Trypsin-Hemmtest die inhibitorische Aktivität gemessen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 21 und 22 dargestellt.

Wie die Abbildungen zeigen, ist ein relatives Maximum der Freisetzung säurestabiler Inhibitoren sowohl in der Fraktion mit pH 6 als auch in der mit pH 8 vorhanden. Da keine weiteren Messungen mehr erfolgten, ist nicht zu sagen, ob bei pH 8 das Maximum schon erreicht war und ob nicht vielleicht ein weiteres Maximum vorhanden ist.

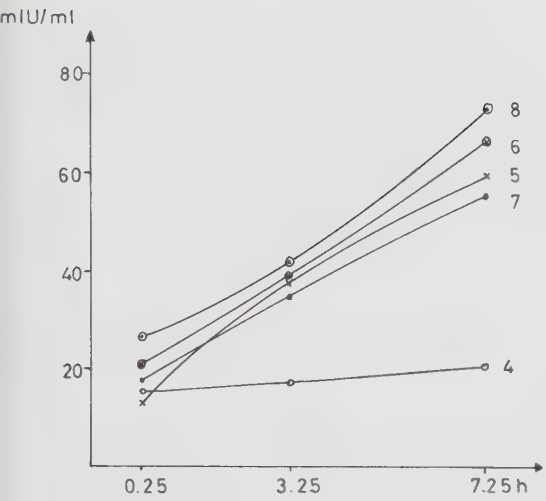

Abb.21: Freisetzung säurestabiler Aktivität durch das sog. Durchlaufenzym bei verschiedenen pH-Werten in sonst vergleichbaren Ansätzen.

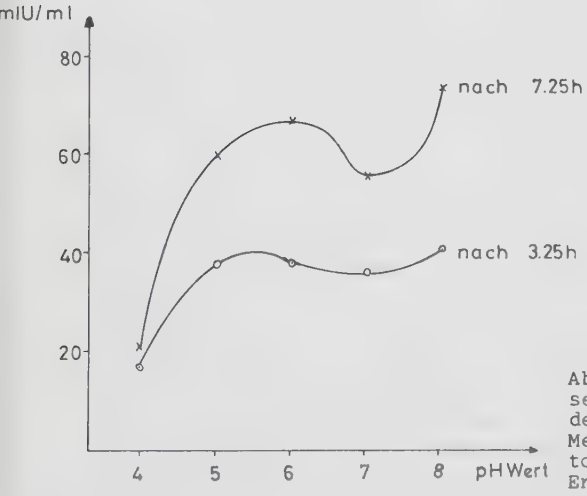

Abb.22: Dieselben Ergebnisse wie Abb.21, jedoch wurde hier die freigesetzte Menge säurestabiler Inhibitoren zu den verschiedenen Entnahmezeiten aufgetragen.

Da kaum anzunehmen ist, daß das gleich Enzym sowohl im sauren, als auch im alkalischen Bereich ein pH-Optimum hat, kann man aus den vorhandenen Ergebnissen wohl schließen, daß in der als Durchlauf bezeichneten Milzfraktion zwei verschiedene Proteasen vorhanden sind, die aus menschlichem ITI einen säurestabilen Inhibitor freisetzen können, wobei eine davon im Sauren (bei pH 6) und eine aktivere im Alkalischen (bei pH 8 ?) besser spaltet.

4.4.2. Gel-Filtration zur Bestimmung des Molekulargewichtes

300 mg des lyophilisierten Durchlaufproteins wurden in 10 ml Acetatpuffer mit pH 5 gelöst; dies erschien deshalb günstig, weil bei diesem pH etwas Protein denaturiert wird und eine anschliessende Zentrifugation und Verwendung nur des Überstandes schon einen Reinigungsschritt darstellen. Dieser Überstand wurde nun über eine Sephadex G 100 - Säule (3,4 x 210 cm) gefiltert; als Filtrationspuffer wurde 0,1 M Ammoniumacetat-Puffer mit einem pH von 8,6 verwendet. Die erhaltenen Fraktionen hatten ein etwas variierendes Volumen um 15 ml.
Jede vierte Fraktion, beginnend mit 17, wurde nun lyophilisiert; frühere Versuche hatten nämlich gezeigt, daß die Enzymkonzentration nach Gel-Filtration zu gering war, um bei Inkubation mit ITI eine meßbare Freisetzung säurestabiler Inhibitoren zu erzeugen. Zu jeder lyophilisierten Fraktion wurde 1 ml ITI, 1 : 10 mit Acetatpuffer verdünnt, gegeben und 24 Stunden im Wasserbad inkubiert. Danach erfolgte Zugabe von 100 ul Perchlorsäure, Zentrifugation, Neutralisation des Überstandes und Messung der antitryptischen Aktivität im Trypsin-Hemmtest, dessen Ergebnisse Abbildung 23 zeigt. Die inhibitorische Aktivität wurde dabei so umgerechnet, daß sie sich auf ein Volumen von 15 ml in den Fraktionen bezieht. Mit Trypsin sind bei diesem Testansatz 100 mIU/ml freilegbar.

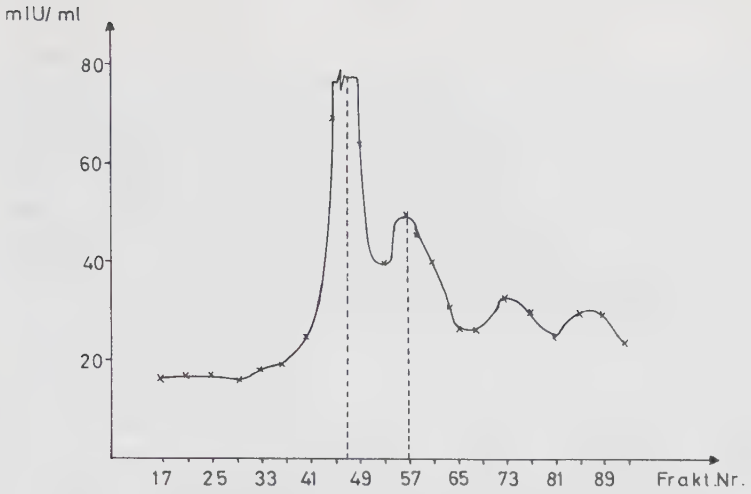

Abb. 23: Säurestabile Aktivität in den einzelnen lyophilisierten Filtrationsfraktionen nach 26-stündiger Inkubation mit ITI bei pH 5.

Auch diese Abbildung zeigt wieder mindestens zwei relative Freisetzungsmaxima bei Fraktion 45 und 57. Dies stimmt sehr gut überein mit den Ergebnissen der pH-Optimumsbestimmung. Da hier bei saurem pH gespalten wurde, kann man vermuten, daß das höhere relative Maximum bei Fraktion 45 dem Enzym mit pH-Optimum bei 6, das niedrigere relative Maximum bei Fraktion 57 dem im Alkalischen besser spaltenden Enzym entspricht.
Um das Molekulargewicht dieser Enzyme bestimmen zu können, mußte die Filtrationssäule geeicht werden. Dazu wurde folgende Lösung hergestellt: zu 10 ml 0,2%iger Dextranblaulösung der Fa. Fine Chemicals, Uppsala mit einem Molekulargewicht von 2 000 000 für Dextranblau wurden 25 mg Chymotrypsinogen mit einem Molekulargewicht von 25 700 und 25 mg Cytochrom c mit einem Molekulargewicht von 11 700, beide von Serva, Feinbiochemica, Heidelberg zugegeben. Diese Lösung wurde über Sephadex G 100 unter vergleichbaren Bedingungen wie oben gefiltert. Die Absorption wurde bei 280 nm gemessen. Dabei zeigte sich das Absorptionsmaximum

durch Dextranblau nach 505 ml
durch Chymotrypsinogen nach 763 ml
durch Cytochrom c nach 1098 ml Filtrationsvolumen.

Da bei Sephadex G 100 im Molekulargewichtsbereich zwischen 10 000 und 100 000 lineare Abhängigkeit zwischen Filtrationsvolumen und dem Logarithmus des Molekulargewichts besteht, ist es mit diesen Angaben möglich, eine Eichkurve zu zeichnen und über das bekannte Filtrationsvolumen, das bis Fraktion 45 669 ml und bis Fraktion 57 810 ml betrug, das MG der Durchlaufproteine zu bestimmen.

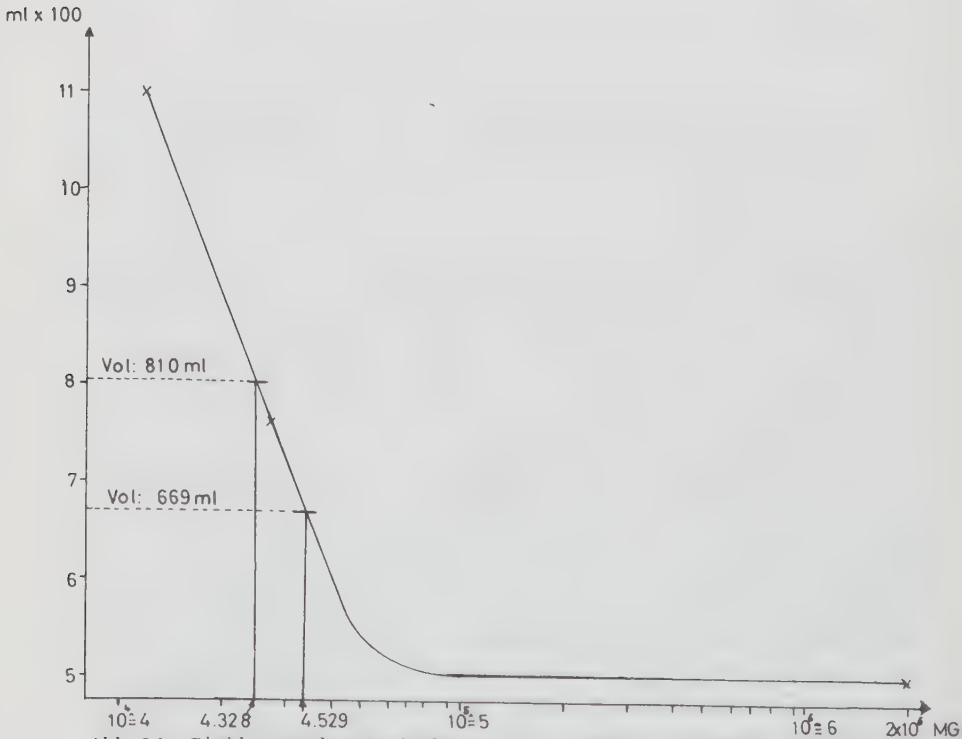

Abb.24: Eichkurve der Sephadex G 100 - Säule und daraus die Bestimmung des Logarithmus des MG der beiden Durchlaufenzyme.

Wie aus Abb. 24 zu ersehen ist, ergibt sich der Logarithmus des Molekulargewichts mit 4,328 bzw. 4,529. Daraus errechnet sich ein MG von etwa 21 300 für das im Alkalischen besser spaltende und von etwa 33 800 für das im Sauren besser spaltende Enzym.

4.4.3. Charakterisierung des freigesetzten Inhibitors

Von besonderer Wichtigkeit für die im Milzdurchlauf gefundenen Enzyme ist es, ihr Produkt, den freigelegten säurestabilen Inhibitor, genauer zu charakterisieren, da nur so entschieden werden kann, ob diesen in der Milz gefundenen Proteasen irgendeine Bedeutung für die Freilegung des physiologischen säurestabilen I 34 im Serum zugeschrieben werden kann.
Eine genaue Charakterisierung kann am besten mit Hilfe einer Immunelektrophorese erfolgen, da die säurestabilen Proteaseinhibitoren auf diesem Gebiet sehr genau untersucht sind und mit dieser Methode auch unterscheidbar sind (19).
Für diese Immunelektrophorese wurden die restlichen Überstände aus der pH-Optimumsbestimmung vereinigt und in einer Amicon Druckkammer mit Diaflo Ultrafilter Typ U M 2 konzentriert bis die Probe eine Aktivität von etwa 7 mIU/ul zeigte, da andere Versuche gezeigt hatten, daß bei geringerer Aktivität kein Präzipitat zustande kommt. Als Antikörper gegen die so präparierten Inhibitoren wurde monospezifisches Antiserum gegen den Inter-alpha-Trypsin Inhibitor vom Kaninchen verwendet.
Die Ergebnisse der Immunelektrophorese zeigt Abb. 25 a und b. Beide zeigen auf der linken Seite - hier wurden 5 ul Humanserum aufgetragen - das Präzipitat des Inter-alpha-Trypsin Inhibitors. Auf der rechten Seite - bei 25 a wurden 10 ul und bei 25 b 5 ul Probe aufgetragen - zeigen beide zwei Präzipitate, von denen das untere mit dem linken Teil jeweils übereinstimmt und unspezifisch

zu sein scheint, das obere jedoch eindeutig dem physiologischen I 34 entspricht.

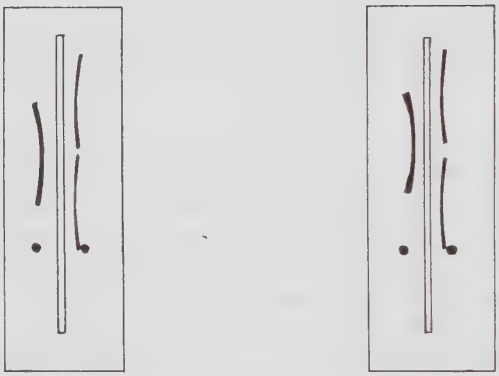

Abb.25: Schematische Darstellungen der immunelektrophoretischen Untersuchungen der durch die Milzenzyme freigelegten säurestabilen Inhibitoren.
Linke Seite, a und b: Nativer ITI (frisches Humanserum)
Rechte Seite, a und b: Säurestabile Inhibitoren nach Freilegung aus dem ITI durch Milzenzyme. Das obere Präzipitat entspricht dem phsiologischen Inhibitor mit MG 34 000.

In der Rindermilz ist somit mindestens ein Enzym vorhanden, das aus dem humanen ITI den im Serum vorkommenden physiologischen I 34 freisetzen kann.

5. Material

Alle organischen und anorganischen Materialien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Fa. E. Merck, Darmstadt bezogen. Trypsin vom Rind, ebenfalls von Merck, war mit Tos-Phe-CH_2-Cl stabilisiert. Triäthanolamin stammte von Boehringer, Mannheim, Azocasein von Serva, Heidelberg.
Human-ITI, der verwendet wurde, um immunelektrophoretische Nachweismöglichkeiten nützen zu können, war von Behring, Mannheim.
Leicht hämolytisches Rinderserum wurde von der Fa. Winklmann, München bezogen.
DEAE-Cellulose S H 23, Bio-Gel A-5m und Sephadex G 100 waren von Serva, Fine Chemica, Uppsala.
Sämtliche Puffer und Lösungen wurden unter Verwendung von bidestilliertem Wasser hergestellt:

Puffer zu Beginn der Elution, sog. Anfangspuffer: 0,04 M Tris mit H_3PO_4 85%ig auf pH 8,6 eingestellt + 200 mg/l Natriumacid + 18 mg/l Benzamidin.

Puffer am Ende der Elution, sog. Endpuffer: 0,5 M Tris + 33,8 ml/l H_3PO_4 85%ig, pH 4,3, + 200 mg/l Natriumacid + 18 mg/l Benzamidin.

Puffer über Sephadex G 100: 0,1 M Ammoniumacetat, mit 30%iger Ammoniaklösung auf pH 8,6 eingestellt + 0,002% Chlorhexidin.

Puffer über Bio-Gel A-5m: 0,05 M Natriumacetat, mit Essigsäure auf pH 6,0 eingestellt + 0,02% Natriumacid + 18 mg/l Benzamidin.

Puffer des Trypsin-Hemmtests: 0,2 M TRA mit 2N NaOH auf pH 7,8 eingestellt.

Puffer zur Aufbewahrung des ITI: 0,1 M Tris, mit 2 N HCl auf pH 7,5 eingestellt.

Physiologische Kochsalzlösung: 0,9 g/l NaCl.

Tris-Puffer: 0,1 M Tris, mit 2 N HCl auf pH 7,5 eingestellt

Acetat-Puffer: 0,2 M Natriumacetat, mit 30%iger Essigsäure auf pH 5 eingestellt.

TRA-Puffer: 0,05 M TRA mit 2 N NaOH auf pH 7,8 eingestellt.

6. Zusammenfassung

Aus dem Inter-alpha-Trypsin Inhibitor des Serums kann durch einen Überschuß von Trypsin - über einen Trypsin-Inhibitor-Komplex - ein inhibitorisch wirksames Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 14 000 freigelegt werden; dieses Protein entsteht ebenfalls durch Behandlung eines in Serum und Urin vorkommenden säurestabilen Inhibitors mit einem Molekulargewicht von etwa 34 000 mit Trypsin im Überschuß. Dieser Inhibitor wird intravital kontinuierlich aus dem Inter-alpha-Trypsin Inhibitor abgespalten und kommt physiologischerweise in einer Konzentration von 5 - 10 mIU/ml Serum vor, wobei diese Konzentration in sehr engen Grenzen gehalten wird.
Als Enzyme, die den ITI zum I 34 abbauen, sind bislang nur Kallikrein und Plasmin bekannt, sie sind wahrscheinlich jedoch nicht die physiologischen Enzyme, da mit Kallikrein die Reaktion nur sehr langsam abläuft und Plasmin vom entstandenen Produkt, dem physiologischen I 34, schwach gehemmt wird. Da im Serum bislang keine weiteren freisetzenden Enzyme gefunden wurden, wurde in einzelnen Geweben des Rindes danach gesucht.
Um Gewebsversuche durchführen zu können, wurde zunächst Rinder--ITI gewonnen. Dazu wurde Rinderserum mit einem Ionenaustauscher versetzt und schrittweise mit Tris-Puffer eluiert. Sie erfolgte erst bei relativ niedrigem pH. Die erhaltene Flüssigkeit wurde konzentriert, Inter-alpha-Trypsin Inhibitor mit Neutralsalz ausgefällt wieder in Puffer aufgenommen und über Sephadex G 100 gefiltert. So konnten aus zwei Liter Rinderserum etwa 11 000 mIU Inter-alpha-Trypsin Inhibitor gewonnen werden.
Dieser ITI wurde mit verschiedenen Geweben inkubiert. Diese wurden dazu gereinigt, homogenisiert und zentrifugiert, sodaß von jedem Gewebe Zellsaft und Zelltrümmer vorhanden waren. Beide wurden mit Inter-alpha-Trypsin Inhibitor versetzt und im Wasser-

bad bei 37°C inkubiert. Der Zuwachs säurestabiler Aktivität wurde im Trypsin-Hemmtest gemessen. Dabei zeigte sich unter den beschriebenen Bedingungen in den Organproben von Niere, Glandula sublinqualis und Lymphknoten kein Anhaltspunkt für ein ITI-freilegendes Enzym. Die Inkubationvon Inter-alpha-Trypsin Inhibitor mit Lungengewebe zeigte kein eindeutiges Ergebnis, eine Freilegung ist nicht auszuschließen. Pankreasgewebe zeigte eine sehr schnelle Freilegung säurestabiler Aktivität; es ist aber wahrscheinlich, daß es sich bei dem freilegenden Enzym um Trypsin handelt. Auch Lebergewebe zeigte eine geringe Freisetzung eines säurestabilen Inhibitors. Eine eindeutige Freilegung wurde bei Inkubation von Gewebsproben aus Rindermilz mit ITI gefunden: Milzsaft und Pankreassaft legten etwa gleichviel säurestabile Inhibitoren in der gleichen Zeit frei, nur noch übertroffen von den Zelltrümmern aus der Milz.

Milzsaft wurde dann mit einem Ionenaustauscher versetzt, die Elution erfolgte schrittweise mit verschieden konzentrierten Kochsalzlösungen. Die vier erhaltenen Fraktionen wurden getrennt untersucht, dabei zeigten Tests mit Azocasein, daß der sogenannte Durchlauf die höchste Proteasenaktivität hatte, und Versuche mit Human-ITI, daß der Durchlauf am schnellsten säurestabile Inhibitoren freilegt. Daneben zeigte sich auch in der Fraktion, die mit 0,45 M Cl^- eluiert worden war, eine gewisse Aktivität in beiden Tests.

Nun wurde eine Bestimmung des pH-Optimums des Durchl[illegible]s durchgeführt mit dem überraschenden Ergebnis, daß zwei verschiedene Enzyme vorhanden sind, von denen eines das pH-Optimum zwischen 5 und 6, das andere bei 8 hat. Eine Gel-Filtration bestätigte dieses Ergebnis und nach Eichung der Filtrationssäule konnten die Molekulargewichte bestimmt werden: Das Molekulargewicht für das erste Enzym, das im Sauren besser spaltet, liegt bei etwa 33 800, das für das zweite, das sein pH-Optimum wahrscheinlich im alkalischen Bereich hat, bei etwa 21 300.

Um eine mögliche physiologische Relevanz dieser Enzyme zeigen zu können, wurden die durch die Durchlaufenzyme freigelegten säurestabilen Inhibitoren mittels Immunelektrophorese charakterisiert. Es zeigte sich dabei, daß die gefundenen Milzproteasen aus dem Inter-alpha-Trypsin Inhibitor den physiologischen säurestabilen Proteaseninhibitor mit Molekulargewicht 34 000 freisetzen.

Literaturverzeichnis

1.) Astrup,T.,K. Alkjaer, F. Soardi:
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 11 (1959) 181

2.) Astrup,T., I. Sterndorf:
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 7 (1955) 239

3.) Bretzel,G., K. Hochstraßer:
Z. Physiolog. Chem. 357 (1976) 487

4.) Feuth, H., B. Kemkes, K. Hochstraßer:
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Forum, p 133 (1975)

5.) Fritz, H., J. Tauschold, E. Werle (1974):
in: Methoden der enzymatischen Analyse. (Bergmeyer, H.K.
ed. 3rd edn Vol 1, Verlag Chemie, Weinheim, Bergstr.)

6.) Fritz, H., J. Tauschold, E. Werle (1974):
in: Methoden der enzymatischen Analyse. (Bergmeyer, H.K.
ed.3rd edn Vol 1 pp 1105-1122, Verlag Chemie, Weinheim.)

7.) Hochstraßer, K., G. Bretzel, E. Wachter, S. Heindl:
Z. Physiol. Chem. 356 (1975) 1865

8.) Hochstraßer, K., G. Bretzel, H. Feuth, W. Hilla, K. Lempart:
Z. Pysiol. Chem. 357 (1976) 153

9.) Hochstraßer, K., H. Feuth, K. Hochgesand:
Bayer SymposiumV "Proteinase Inhibitors", p 111,
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974.

10.) Hochstraßer, K., H. Feuth, J. Fall, B. Kemkes:
Klin. Wschr. 52 (1974) 1015

11.) Hochstraßer, K., H. Feuth, B. Kemkes, J. Fall, E. Werle:
Klin. Wschr. 52 (1974) 1018

12.) Hochstraßer, K., H. Feuth, O. Steiner:
Z. Physiol. Chem. 354 (1973) 927

13.) Hochstraßer, K., N. Heimburger, R. Reichert:
Z. Physiol. Chem. 354 (1973) 587

14.) Hochstraßer, K., J. Niebel, H. Feuth, K. Lempart:
Klin. Wschr. 55 (1977) 337

15.) Hochstraßer, K., J. Niebel, K. Lempart:
Klin. Wschr. 55 (1977) 343

16.) Hochstraßer, K., B. Rasche, C. Mietens, K. Schorn, C.E.v. Pilar, A. Blum:
Pneumonologie Suppl. (1976) 137

17.) Hochstraßer, K., B. Rasche, R. Reichert, K. Hochgesand:
Pneumonologie 150 (1974) 253

18.) Hochstraßer, K., R. Reichert, H. Haendle, E. Werle:
Z. Physiol. Chem. 325 (1971) 954

19.) Hochstraßer, K., R. Reichert, R. Schwarz, E. Werle:
Z. Physiol. Chem. 353 (1972) 221

20.) Kato, I., J. Schrode, K.A. Wilson, M. Laskowski jr.:
Protides of the Biol. Fluids XXIII, p 235

21.) Peterson, E.A., G. Chiazze:
Arch. Biochem. Biophys. 99 (1962) 141

22.) Procksch, G.H., J.I. Routh:
J. Lab. Clin. Med. 79 (1972) 491

23.) Reichert, R., K. Hochstraßer, G. Conradi:
Pneumonologie 147 (1972) 13

24.) Reichert, R., K. Hochstraßer, K. Hochgesand:
Münch. Med. Wschr. 116 (1974) 173

25.) Shulman, N.R.:
J. Biol. Chem. 213 (1955) 656

Lebenslauf

Am 16. März 1953 wurde ich, Wolfgang Paulus, als Sohn des Dipl.-Ing. Max Paulus und seiner Ehefrau Eva, geb. Leutner, in Straubing geboren und nach römisch-katholischem Ritus getauft.

Nach dem Besuch der Volksschule St. Peter in Straubing (1959 - 1964) trat ich in die Oberrealschule, das jetzige Ludwigsgymnasium in Straubing ein und legte dort 1973 die Reifeprüfung ab.

Am 28. August 1972 verstarb mein Vater.

Im Herbst 1973 begann ich mit dem Studium der Physik, im Frühjahr 1974 mit dem der Humanmedizin. Im Sommer 1975 legte ich die ärztliche Vorprüfung, im Sommer 1976 den ersten und im Sommer 1978 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab. Meine praktische Ausbildung absolvierte ich an der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München, am Städtischen Krankenhaus in Landshut und am Bezirkskrankenhaus Haar. Den dritten Teil der ärztlichen Prüfung bestand ich am 30. Oktober 1979 in München, am 14. November 1979 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.

Von Februar bis November 1977 arbeitete ich experimentell in der Hals-Nasen-Ohren Klinik der Universität München an der vorliegenden Dissertation.